

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

Μελέτη νέων φωτοενεργοποιούμενων φαρμάκων για θεραπεία καρκίνου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαρία Αρβανιτίδου

Επιβλέπουσα : Ελένη Αλεξανδράτου Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π, Βαθμίδα Α'

Αθήνα, Οκτώβριος 2020



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

Μελέτη νέων φωτοενεργοποιούμενων φαρμάκων για θεραπεία καρκίνου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μαρία Αρβανιτίδου

Επιβλέπουσα : Ελένη Αλεξανδράτου Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π, Βαθμίδα Α'

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 30 Οκτωβρίου 2020.

..... Ε. Αλεξανδράτου Ε.ΔΙ.Π. Ε.Μ.Π, Βαθμίδα Α΄ Αν. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

..... Κ. Πολιτόπουλος

..... Ε. Χριστοφόρου Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2020

.....

Μαρία Αρβανιτίδου Πτυχιούχος Φυσικός Πανεπιστημίου Πατρών

Copyright © Μαρία Αρβανιτίδου, 2020 Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο συχνούς τύπους καρκίνου που εμφανίζεται στις γυναίκες και η κύρια αιτία θανάτου αυτών, στις χώρες της Ευρώπης. Κάποιοι από τους τρόπους αντιμετώπισής του είναι η μαστεκτομή, η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία κι άλλοι. Ωστόσο, οι θεραπευτικές αυτές μέθοδοι είναι ιδιαίτερα επώδυνες για τον ασθενή, για αυτό το λόγο χρειάστηκε να αναζητηθούν καινούριες. Μια από αυτές είναι η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT).

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία ελάχιστα επεμβατική μέθοδος που βασίζεται στην αλληλεπίδραση τριών στοιχείων: του φωτοευαισθητοποιητή (PS), της ακτινοβολίας και του οξυγόνου. Ο συνδυασμός των στοιχείων αυτών οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο λόγω της επαγωγής τοξικότητας σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, μετά τη χορήγηση της φωτοευαίσθητης ουσίας στον ασθενή, αυτή συσσωρεύεται στα καρκινικά κύτταρα κι έπειτα ακτινοβολείται η πάσχουσα περιοχή με φως κατάλληλου μήκους κύματος που αντιστοιχεί στη ζώνη απορρόφησης της ουσίας. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι να λάβουν χώρα μία σειρά από διεργασίες λόγω της παρουσίας του οξυγόνου, και να παραχθούν ελεύθερες ρίζες (ROS) και μονήρες οξυγόνο, ώστε τελικά να επέλθει ο κυτταρικός θάνατος.

Η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας εξαρτάται από τους φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται, καθώς παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους ως προς την επιλεκτικότητα τους, το χρόνο αποβολής τους από τον οργανισμό, τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές τους ιδιότητες και τελικά τη φωτοδυναμική τους δράση.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη ενός νέου συμπλόκου της Κουρκουμίνης με το Γάλλιο ως πιθανού φωτοευαισθητοποιητή για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Το νέο αυτό σύμπλοκο μελετήθηκε ως προς τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές του ιδιότητες καθώς και ως προς την φωτοδυναμική του δράση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7 cancer cells). Επίσης πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των ιδιοτήτων και της δράσης του συμπλόκου με αυτών της Κουρκουμίνης Ι. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης διαφόρων συγκεντρώσεων και διαλυτών, φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού και φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης, τόσο με φθορισμό όσο και με απορρόφηση. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών από το σύμπλοκο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε κυτταρικό επίπεδο. Αρχικά, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού κατά την αλληλεπίδραση τους με την ουσία απουσία φωτός (dark toxicity), καθώς και ο χωρικός εντοπισμός του συμπλόκου στα κύτταρα αυτά. Τέλος, μελετήθηκε η φωτοδυναμική δράση έχοντας το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως φωτοευαισθητοποιητή. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συγκρίθηκαν με την Κουρκουμίνη Ι και είναι ιδιαιτέρως ενθαρρυντικά για μελλοντική χρήση της ουσίας ως φωτοευαισθητοποιητή στη φωτοδυναμική θεραπεία καθώς η προσθήκη του Γαλλίου βελτίωσε σημαντικά τα χαρακτηριστικά και τη φωτοδυναμική δράση της Κουρκουμίνης Ι.

Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου σχεδιάστηκε από την Ερευνήτρια Δρ. Μαρίνα Σαγνού και συντέθηκε από το συνεργαζόμενο ερευνητή Δρ. Ελευθέριο Χαλέβα , στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR), στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Βιοεφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

<u>Λέξεις κλειδιά</u>: Φωτοδυναμική θεραπεία, σύμπλοκο Κουρκουμίνης - Γαλλίου, Κουρκουμίνη Ι, απορρόφηση, φθορισμός, ελεύθερες ρίζες, φωτολεύκανση, φωτοευαισθητοποιητής, καρκίνος του μαστού, χωρικός εντοπισμός

Abstract

Breast cancer is one of the most common types of cancer to appear in women in Europe, and the main cause of death amongst them. Means of breast cancer treatment include mastectomy, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy, etc. However, the pre-mentioned therapeutic approaches are remarkably painful to patients, and therefore the need for new treatments emerged. Photodynamic Therapy (PDT) is one of them.

Photodynamic Therapy is a minimally interventional process that relies on the interactions between three elements; photosensitive substances (PS), radiation and oxygen. The combination of these three elements leads to cell death, since toxicity is inducted in the cells. To elaborate, the photosensitive substance is dispensed to the patient, so it accumulates in the cancer cells. Thereafter, the affected area is radiated with light that has a compatible wavelength with the absorption band of the substance. The results of this process are the following: a series of processes takes place due to the presence of oxygen, while free radicals (ROS) and singlet oxygen are being produced, so finally cell death occurs.

The effectiveness of Photodynamic therapy depends on the photosensitizers that are being used, since there is a large differentiation between these substances in relation to their selectivity, the elimination time from the body, their photophysical and photochemical properties and their photodynamic efficiency.

The present Master's Thesis focused on the study of the new curcumin - gallium complex as a potential photosensitizing drug in photodynamic therapy of cancer. This new compound was studied for its photophysical and photochemical properties but also for its photodynamic efficiency in breast cancer cells (MCF-7). Also, a comparative study of the properties and photodynamic action of the newly synthesized complex with Curcumin I was performed.

More specific, spectroscopic studies of absorption at different concentrations and solvents were performed, as well as spectroscopic studies of fluorescence and photobleaching by measuring absorbance and fluorescence. The complex was also studied for its ability to produce reactive oxygen species (ROS). Furthermore, the complex was studied at the cellular level. At first, dark toxicity of the new compound at breast cancer cells was studied, as well as its intracellular localization with confocal microscopy. Then, photodynamic therapy experiments were performed in order to test Curcumin -Gallium complex photodynamic efficiency in breast cancer cells. Results of the above-mentioned experiments, were compared with Curcumin I and are particularly encouraging for the use of the new compound as a potential photosensitizer during Photodynamic therapy as there are evidence that the addition of Gallium significantly improved Curcumin I characteristics and PDT efficiency.

The new Curcumin-Gallium complex was designed by Dr. Marina Sagnou, Researcher and composed by Dr. Eleftherios Halevas, Collaborative Researcher at the Institute of Biosciences & Applications of the National Research Center of Scientific Sciences "Democritos".

<u>KeyWords</u>: Photodynamic Therapy, Curcumin-Gallium complex, Curcumin I, absorption, fluorescence, reactive oxygen species, photobleaching, photosensitizer, breast cancer, intracellular localization

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Ε.Μ.Π.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ελένη Αλεξανδράτου, εργαστηριακό διδακτικό προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π.), βαθμίδας Α του Ε.Μ.Π. για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία. Χωρίς τη στήριξη, τη βοήθεια και την καθοδήγησή της δεν θα ήταν εφικτό να την ολοκληρώσω.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κων/νο Πολιτόπουλο, αναπληρωτή καθηγητή του Ε.Μ.Π., για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην αντιμετώπιση των δυσκολιών που προέκυψαν με τις πειραματικές διατάξεις. Ακόμη, ευχαριστώ την Ελένη, υποψήφια διδάκτορα, για τις χρήσιμες συμβουλές της και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών & Εφαρμογών και κυρίως τους ερευνητές Δρ. Μαρίνα Σαγνού, Δρ. Βαρβάρα Μαυροειδή και Δρ. Ελευθέριο Χαλέβα, καθώς μου παρείχαν την προς μελέτη ουσία και με βοήθησαν να φέρω εις πέρας τα πειράματα που σχετίζονται με τις κυτταρικές καλλιέργειες.

Πάνω απ' όλα όμως, είμαι ευγνώμων στην οικογένειά μου και τις φίλες μου για την αγάπη, την υπομονή και την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, σε κάθε στάδιο της ζωής μου. Δεν έπαψαν ποτέ να πιστεύουν σε μένα και με βοήθησαν ο καθένας με τον τρόπο του να εκπληρώσω τους στόχους μου, δίνοντας μου θάρρος και δύναμη να συνεχίσω. Σας ευχαριστώ.

Στους γονείς μου, **Νίκο και Άννα**

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψ	η	ii	
Abstract		iv	
Ευχαρισ	τίες	vi	
Πίνακας	περιεχομένων	viii	
Κατάλογ	ος σχημάτων	xii	
Κατάλογ	ος πινάκων	xiv	
Κεφάλαι	ιο 1°: Η Φωτοδυναμική θεραπεία	1	
1.1	Ιστορική αναδρομή	2	
1.2	Η φωτοδυναμική θεραπεία		
1.3	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φωτοδυναμικής θεραπείας	5	
1.4	Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης	7	
1.4.	1 Φωτοφυσική δράση	8	
1.4.	2 Φωτοχημική δράση	8	
1.4.	3 Φωτοβιολογική δράση	10	
1.5	Μηχανισμοί καταστροφής κυττάρων	10	
1.5.	1 Απόπτωση	11	
1.5.	2 Νέκρωση	12	
1.5.	3 Αυτοφαγία	12	
Κεφάλαι	ιο 2º: Φωτοευαισθητοποιητές	14	
2.1	Χαρακτηριστικά Φωτοευαισθητοποιητών	15	
2.2	Κατηγορίες Φωτοευαισθητοποιητών	16	
2.2.	1 Φωτοευαισθητοποιητές 1 ^{ης} γενιάς		
2.2.	2 Φωτοευαισθητοποιητές 2 ^{ης} γενιάς	17	
2.2.	3 Φωτοευαισθητοποιητές 3 ^{ης} γενιάς	20	
Κεφάλαι	ο 3º: Κουρκουμίνη	23	
3.1	Εισαγωγή	24	
3.2	Δομή κουρκουμίνης	25	
3.3	Ιδιότητες και χρήσεις της κουρκουμίνης	26	
3.4	Κουρκουμίνη στη Φωτοδυναμική θεραπεία	27	
Κεφάλαι	Κεφάλαιο 4°: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες		
4.1	Σκοπός της πειραματικής μελέτης	30	
4.2	Πειραματικές διατάξεις		
4.2.	1 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης		

	4.2.2	Φασματοφωτόμετρο φθορισμού
	4.2.3	Διάταξη ακτινοβόλησης
	4.2.4	Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser
4.	.3 Oud	ίες
	4.3.1	Κουρκουμίνη Ι
	4.3.2	Σύμπλοκο Κουρκουμίνης - Γαλλίου
	4.3.3	DMSO
	4.3.4	PBS
	4.3.5	Αιθανόλη
	4.3.6	NADH
	4.3.7	FBS
	4.3.8	Αντιβιοτικό
	4.3.9	DMEM
	4.3.10	Τρυψίνη
	4.3.11	Ισοπροπανόλη
	4.3.12	MTT
Кεф	άλαιο 5°:	Πειραματικές μέθοδοι και πρωτόκολλα
5.	.1 Μεθ	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου
5.	. 1 Μεθ 51	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες ώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες ώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες ώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες ωσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 2 Μεθ	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5.	 Μεθ 51 Μεθ 51 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 Μεθ 5.2.1 	Ο οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5.	1 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 2 Μεθ 5.2.1 5.2.2	Ο οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5.	 Μεθ 51 Μεθ 51 συγκεντρ 1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 Mεθ 5.2.1 5.2.2 5.2.3 	Οοδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5. 5.	 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 2 Μεθ 5.2.1 5.2.1 5.2.2 5.2.3 3 Έλεγ 	Οοδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες οώσεις
5. 5.	 Μεθ 51 5.1.1 συγκεντρ 5.1.2 διαλύτες 5.1.3 συγκεντρ 5.1.4 5.1.5 5.1.6 2 Μεθ 5.2.1 5.2.2 5.2.3 3 Έλεγ 5.3.1 	οδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες ώσεις

5.5 7	Μεθ 59	θοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά Μ	CF-
Κεφάλαι	lo 6º:	Αποτελέσματα και συμπεράσματα	61
6.1	Φαα	σματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλία	ου
σε δια	ιλύμο	ιτα με διάφορες συγκεντρώσεις	62
6.1.	1	Αποτελέσματα	62
6.1.	2	Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	64
6.1.	3	Συμπεράσματα	66
6.2 σε δια	Φαα λύμο	σματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλία ατα με διάφορους διαλύτες	ου 67
6.2.	1	Αποτελέσματα	68
6.2.	2	Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	68
6.2.	3	Συμπεράσματα	71
6.3	Φαα	σματοσκοπική μελέτη φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου	σε
διαλύ	ματα	με διάφορες συγκεντρώσεις	72
6.3.	1	Αποτελέσματα	73
6.3.	2	Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	74
6.3.	3	Συμπεράσματα	76
6.4 Γαλλία	Φαα ου με	σματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης- τη μέθοδο απορρόφησης	77
6.4.	1	Αποτελέσματα	78
6.4.	2	Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	80
6.4.	3	Συμπεράσματα	80
6.5	Φαα	σματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-	
Γαλλία	ου με	τη μέθοδο φθορισμού	81
6.5.	1	Αποτελέσματα	82
6.5.	2	Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	84
6.5.	3	Συμπεράσματα	84
6.6	Φαα	σματοσκοπική μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών του	
συμπλ	όκου	ι Κουρκουμίνης-Γαλλίου	85
6.6.	1	Αποτελέσματα	86
6.6.	2	Σύγκριση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι	88
6.6.	3	Συμπεράσματα	89
6.7	Μελ	ιέτη τοξικότητας των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7	90
6.8	Μελ	.έτη χωρικού εντοπισμού των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7	91
6.9	Εφα	ρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά MCF-7	94
Κεφάλαι	. o 7 °:	Συζήτηση	97
7.1	Συμ	περάσματα	98

7.1.1 διάφ	Απορρόφηση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι σε ορες συγκεντρώσεις και διάφορους διαλύτες
7.1.2 διάφ	Φθορισμός συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι σε ορες συγκεντρώσεις
7.1.3 τις με	Φωτολεύκανση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι με θόδους απορρόφησης και φθορισμού100
7.1.4 της Κ	Παραγωγή ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης- Γαλλίου και ουρκουμίνης Ι
7.1.5	Τοξικότητα των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7 απουσία φωτός 101
7.1.6	Χωρικός εντοπισμός των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7102
7.1.7	Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά MCF-7 102
7.2	Μελλοντικά σχέδια - Προοπτικές
Βιβλιογρα	ι φία

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1: Στάδια εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας	5
Σχήμα 2: Φωτοφυσικοί και φωτοχημικοί μηχανισμοί στη φωτοδυναμική θεραπεία	7
Σχήμα 3: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της απόπτωσης	. 11
Σχήμα 4: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της νέκρωσης	12
Σχήμα 5: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της αυτοφαγίας	. 13
Σχήμα 6: Δομή Photofrin	. 17
Σχήμα 7: Το φυτό curcuma longa	. 24
Σχήμα 8: Η ουσία κουρκουμίνη	. 25
Σχήμα 9: Η χημική δομή των κουρκουμινοειδών	. 26
Σχήμα 10: Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης	. 31
Σχήμα 11: Οπτικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης	. 32
Σχήμα 12: Υποδοχές κυβεττών του οργάνου	. 33
Σχήμα 13: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού	. 35
Σχήμα 14: Θέση υποδοχής της κυβέττας στο φασματοφωτόμετρο	. 35
Σχήμα 15: Οπτικό διάγραμμα οργάνου	. 36
Σχήμα 16: Διάταξη ακτινοβόλησης	. 38
Σχήμα 17: Πηγή φωτός για τη φωτεινή ενεργοποίηση του συμπλόκου Κουρκουμίνης- Γαλλίου	39
Σχήμα 18: Φάσμα εκπομπής της πηγής φωτός για τη διέγερση του συμπλόκου	
Κουρκουμίνης Γαλλίου	40
Σχήμα 19: Bridgelux Power LED 10W	40
Σχήμα 20: Φάσμα εκπομπής της πηγής φωτός Bridgelux Power LED 10W για τη διέγερση	της
Κουρκουμίνης Ι	41
Σχήμα 21: Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser	42
Σχήμα 22: Αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser	43
Σχήμα 23: Η χημική δομή της κουρκουμίνης Ι	. 44
Σχήμα 24: Η χημική δομή του DMSO	. 44
Σχήμα 25: Η χημική δομή της αιθανόλης	. 45
Σχήμα 26: Η χημική δομή του NADH	. 46
Σχήμα 27: Σχηματισμός NADH από NAD+ και αντίστροφα	. 46
Σχήμα 28: Απορρόφηση των NAD ⁺ και NADΗ σε σχέση με το μήκος κύματος	. 47
Σχήμα 29: Η χημική δομή της ισοπροπανόλης	. 48
Σχήμα 30: Η χημική δομή των ΜΤΤ και φορμαζάνης	. 49
Σχήμα 31: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διάφορες	
συγκεντρώσεις	. 63
Σχήμα 32: Διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης του συμπλόκου	
Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως προς τη συγκέντρωση	. 64
Σχήμα 33: Συγκριτικό φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και τ	ης
Κουρκουμίνης Ι με συγκέντρωση 2x10 ⁻⁵ Μ	. 65
Σχήμα 34: Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης του συμπλόκα	ου
Κουρκουμίνης- Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι ως προς τη συγκέντρωσή τους	. 66
Σχήμα 35: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωση	١S
10 ⁻⁵ Μ σε διάφορους διαλύτες	. 68
Σχήμα 36: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και	
Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ σε διαλύτη DMSO	. 69

Σχήμα 37: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και
Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ σε διαλύτη αιθανόλη
Σχήμα 38: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και
Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ σε διαλύτη PBSΡΟ
Σχήμα 39: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διάφορες
συγκεντρώσεις
Σχήμα 40: Διάγραμμα μεταβολής του μέγιστου φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-
Γαλλίου ως προς τη συγκέντρωση74
Σχήμα 41: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της
Κουρκουμίνης Ι με συγκέντρωση 5x10 ⁻⁷ Μ
Σχήμα 42: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής φθορισμού του συμπλόκου
Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι ως προς τη συγκέντρωση
Σχήμα 43: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης
10 ⁻⁵ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min – 30 min
Σχήμα 44: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της έντασης της απορρόφησης του συμπλόκου
Κουρκουμίνης- Γαλλίου με ακτινοβόληση και χωρίς ακτινοβόληση
Σχήμα 45: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της έντασης της απορρόφησης του συμπλόκου
Κουρκουμίνης- Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι συναρτήσει του χρόνου
ακτινοβόλησης80
Σχήμα 46: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης
0,5x10 ⁻⁶ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min – 30 min
Σχήμα 47: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού του
συμπλόκου Κουρκουμίνης- Γαλλίου στα 531 nm, με ακτινοβόληση και χωρίς
ακτινοβόληση
Σχήμα 48: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού του
συμπλόκου Κουρκουμίνης- Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι ,συναρτήσει του
χρόνου ακτινοβόλησης84
Σχήμα 49: Φάσματα απορρόφησης συγκέντρωσης 10 ⁻⁵ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min
– 30 min του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου
Σχήμα 50: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm, με
ακτινοβόληση και χωρίς ακτινοβόληση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου 88
Σχήμα 51: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm του συμπλόκου
Κουρκουμίνης- Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι συναρτήσει του χρόνου
ακτινοβόλησης
Σχήμα 52: Εικόνες χωρικού εντοπισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου
Σχήμα 53: Εικόνες χωρικού εντοπισμού Κουρκουμίνης Ι
Σχήμα 54: Εικόνες αναφοράς93
Σχήμα 55: Βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης για τις
δύο ουσίες και την αναφορά95

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W 40
Πίνακας 2: Συγκριτικός πίνακας συγκέντρωσης, απορρόφησης στα 480 nm και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου
Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας συγκέντρωσης, μέγιστης απορρόφησης και μήκους κύματος
μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της
Κουρκουμίνης Ι
Πίνακας 4: Πίνακας συγκέντρωσης, μέγιστης απορρόφησης και μήκους κύματος μέγιστης
απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου
Πίνακας 5: Πίνακας απορρόφησης και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το
σύμπλοκο Κουρκουμίνης- Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10 ⁻⁵ Μ 71
Πίνακας 6: Πίνακας συγκέντρωσης και μένιστης τιμής φθορισμού στα 531 nm του συμπλόκου
Κουρκουμίνης- Γαλλίου
Πίνακας 7: Πίνακας μένιστης τιμής Φθορισμού στα 531 nm και μήκους κύματος διένερσης
του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι
Πίνακας 8: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης, και έντασης της απορρόφησης στα 460 nm
του συμπλόκου Κουοκομμίνος-Γαλλίου
Πίνακας 9: Πίνακας τιμών γοόνου ακτινοβόλησης, και μένιστης τιμής Φθορισμού στα 531 ημ
του συμπλόκου Κουοκοιμώνος Γαλλίου
πινακάς το: πινακάς τιμών χρόνου ακτινορολησής και τιμής απορροφήσης στα 340 nm του
συμπλοκου κουρκουμινης-ι αλλιου8/

Α' Μέρος - Θεωρητικό

Κεφάλαιο 1°: Η Φωτοδυναμική θεραπεία

1.1 Ιστορική αναδρομή

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του φωτός στους τομείς της ιατρικής και της χειρουργικής επέμβασης, έχουν μία πολύ μεγάλη ιστορία, που εκτείνεται από την αρχαιότητα έως σήμερα. Η φωτοθεραπεία, η οποία είναι μια διαδικασία θεραπείας κατά την οποία είναι απαραίτητο το φως του ήλιου, ξεκίνησε την ύπαρξή της από την αρχαία Ελλάδα, την Αίγυπτο, την Κίνα και την Ινδία. Μία από τις παλαιότερες και πιο γνωστές αναφορές του ήλιου ως θεραπευτικού παράγοντα ήταν η ηλιοθεραπεία. Ακόμη, το φως χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως αυτή της λεύκης, της ραχίτιδας, της ψωρίασης, του καρκίνου του δέρματος, καθώς και της ψύχωσης. Έπειτα, εξαφανίστηκε για πολλούς αιώνες, έως ότου ανακαλύφθηκε εκ νέου από τον πολιτισμό της Δύσης στις αρχές του 20^{ου} αιώνα [1], [2].

Στα τέλη του 1800 και στις αρχές του 1900 άρχισε να ακμάζει ξανά η φωτοθεραπεία. Ο Arnold Rikli επανάφερε στο προσκήνιο τις θεραπευτικές ιδιότητες του ηλιακού φωτός. Γι' αυτό θεωρείται συχνά ως ο πρωτοπόρος της σύγχρονης φωτοθεραπείας. Για πολλά χρόνια εργάστηκε για την ανάπτυξη φυσικών θεραπειών που εξακολουθούν να ισχύουν έως σήμερα. Οι προσπάθειες θεραπείας ξεκίνησαν με τη χρήση του ηλιακού φωτός, το οποίο όμως στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από τεχνητές υπεριώδεις πηγές ακτινοβολίας.

Μεγάλη ήταν και η συνεισφορά του Niels Finsen στη σύγχρονη φωτοθεραπεία, καθώς χρησιμοποίησε την υπεριώδη ακτινοβολία για την θεραπεία των δερματικών παθήσεων που προκαλούσε η φυματίωση. Αυτή η μελέτη του χάρισε ένα βραβείο Νόμπελ [2]. Το 1900 ο Oscar Raab, φοιτητής της Ιατρικής Σχολής και ο καθηγητής Herman von Tappeiner, ανακάλυψαν τυχαία ότι επήλθε κυτταρικός θάνατος στις καλλιέργειες από πρωτόζωα (παραμήκια), αφού πρώτα αυτά είχαν ακτινοβοληθεί με ισχυρό φως, υπό την παρουσία ακριδίνης. Για την τελευταία μάλιστα έγινε επιπλέον έρευνα, και ανακαλύφθηκε ότι είναι φωτοευαίσθητη ουσία. Ο Von Tappeiner με τον δερματολόγο Jesionek, περιέγραψαν το 1903 τη χρήση της ηωσίνης ως φωτοευαισθητοποιητή και την ακτινοβόληση από συνδυασμό φυσικού και τεχνητού φωτός για τη θεραπεία του καρκίνου του δέρματος, του λύκου και των κονδυλωμάτων στα γυναικεία γεννητικά όργανα. Το 1904, οι von Tappeiner και Jodlbauer ανέφεραν, έπειτα από πολλές μελέτες, ότι η ύπαρξη του οξυγόνου ήταν

απαραίτητη για την διαδικασία της φωτοευαισθησίας, ενώ το 1907 επινοήθηκε ο όρος «φωτοδυναμική θεραπεία» [3].

Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη της αιματοπορφυρίνης θεωρείται πως είναι το πιο σημαντικό γεγονός για την πρόοδο της φωτοδυναμικής θεραπείας. Το 1912 ο Friedrich Meyer Betz ήταν ο πρώτος που μελέτησε την φωτοευαισθησία και τις φωτοτοξικές επιδράσεις της αιματοπορφυρίνης. Χορήγησε στον εαυτό του 200 mg αιματοπορφυρίνης και εξέθεσε το δέρμα του στο ηλιακό φως για να καταγράψει τα αποτελέσματα. Το 1942, οι Auler και Banzer ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τις φωτοδυναμικές ιδιότητες των πορφυρινών σε καρκινικούς όγκους αρουραίων. Έπειτα, ακολούθησε η ανακάλυψη των παραγώγων των αιματοπορφυρίνων. Αυτό ήταν ένα τεράστιο βήμα για την εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπείας και επιτεύχθηκε από τον Schwartz το 1955, ο οποίος διαπίστωσε ότι η ίδια η αιματοπορφυρίνη είχε επιλεκτικό εντοπισμό στον καρκινικό όγκο και ιστό.

Η σύγχρονη εποχή της φωτοδυναμικής θεραπείας ξεκίνησε με το πρωτοποριακό έργο των Dr. Tom Dougherty και των συνεργατών του τη δεκαετία του 1970. Μελέτησαν συστηματικά την χρήση αιματοπορφυρίνης και των παραγώγων της στην φωτοδυναμική θεραπεία. Ακόμη, ο Dougherty αναφέρετε συχνά ως ο πατέρας της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθώς διέθεσε την πρώτη φωτοευαίσθητη ουσία στο εμπόριο, την οποία και ονόμασε Photofrin [2].

1.2 Η φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) αποτελεί μία ελάχιστα επεμβατική τεχνική [4] για τη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου, προ-καρκινικών καταστάσεων και δερματικών αλλοιώσεων, καθώς και βλαβών της κεφαλής, του λαιμού και της στοματικής κοιλότητας. Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί ακόμα και πριν ή μετά από χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή χειρουργική επέμβαση, χωρίς να ελλοχεύει κίνδυνος αποτυχίας για καμία από τις θεραπείες. Ακόμη, σημαντικό πλεονέκτημά της είναι ότι παρέχει έναν ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο για την επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και ιστών, ελαχιστοποιώντας σημαντικά τις ανεπιθύμητες ενέργειες σε υγιείς ιστούς [5], [6]. Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιοδήποτε όργανο του ανθρώπινου σώματος με τη χρήση ευέλικτων οπτικών ινών.

Τα τρία απαραίτητα και θεμελιώδη στοιχεία της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι το οξυγόνο, ο φωτοευαισθητοποιητής και το φως. Κανένα από αυτά δεν είναι τοξικό από μόνο του, όμως όταν συνδυάζονται και τα τρία μαζί γίνονται πολύ δραστικά [5]. Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, χορηγείται ο φωτοευαισθητοποιητής στον ασθενή, και έπειτα γίνεται η ενεργοποίησή του. Αυτό επιτυγχάνεται με τοπική ακτινοβόληση του πάσχοντος ιστού με φως κατάλληλου μήκους κύματος και ισχύος [6], [7], [8]. Το κατάλληλο μήκος κύματος επιλέγεται με βάση τη ζώνη απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή [5]. Ο τελευταίος, αφού ενεργοποιηθεί, αλληλεπιδρά και μεταφέρει ενέργεια στο μοριακό οξυγόνο ή στο υπόστρωμα [9] παράγοντας ελεύθερες ρίζες ή μονήρες οξυγόνο. Έτσι, ενεργοποιούνται τρεις βασικοί μηχανισμοί που καθιστούν τη φωτοδυναμική θεραπεία μια αποτελεσματική αντικαρκινική διαδικασία: προκύπτουν άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα, δημιουργείται βλάβη στο αγγειακό σύστημα του όγκου με επακόλουθο τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων καθώς και του όγκου λόγω του οξειδωτικού στρες μέσα στα κύτταρα και επάγεται μια ισχυρή φλεγμονώδης αντίδραση που είναι ικανή να οδηγήσει στην ανάπτυξη της συστηματικής ανοσίας [5], [10]. Αυτή η διαδικασία έχει σύντομη διάρκεια ζωής (<0,04 s) και ως αποτέλεσμα μικρή ακτίνα δράσης (<0,02 m).

Η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, εκδηλώνεται με μία διόγκωση της πάσχουσας περιοχής και σχηματισμό νεκρωτικού ιστού. Αυτός ο ιστός τελικά απορρίπτεται και ακολουθεί η επούλωση της περιοχής [9].

Συμπερασματικά, η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελείται από τέσσερα στάδια (σχήμα 1). Στο πρώτο στάδιο, χορηγείται ο φωτοευαισθητοποιητής στον ασθενή. Αυτό γίνεται συνήθως με ενδοφλέβια ένεση, αλλά μπορεί επίσης να χορηγηθεί τοπικά (ως κρέμα) ή από το στόμα. Το δεύτερο στάδιο αφορά την επιλεκτική συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στους καρκινικούς ιστούς. Αυτή η διαδικασία μπορεί να χρειαστεί λίγες ώρες ή ακόμα και ημέρες. Στο τρίτο στάδιο, προκαλείται η ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή με ακτινοβόληση παρουσία οξυγόνου. Τέλος, στο τέταρτο στάδιο γίνεται η πλήρης καταστροφή του όγκου [11].

4



Σχήμα 1: Στάδια εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας [11]

1.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα φωτοδυναμικήςθεραπείας

Η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική θεραπεία [12], κλινικά εγκεκριμένη [5], για την εξάλειψη κακοήθων νόσων και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις παραδοσιακές θεραπείες του καρκίνου, όπως είναι η χημειοθεραπεία, η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία [13]. Κάποια από αυτά είναι τα παρακάτω:

- Η επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [5] καθώς μόνο αυτά εκτίθενται ταυτόχρονα στον φωτοευαισθητοποιητή, το φως και το οξυγόνο [12]
- Είναι ελάχιστα επεμβατική [5]
- Η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα, καθώς αποφεύγονται ταυτόχρονα οι ανεπιθύμητες παρενέργειες στον ασθενή και η τοξικότητα σε υγιείς δομές και ιστούς [5], [6], [13], [6]
- Το εξαιρετικό αισθητικό αποτέλεσμα, γεγονός που την κάνει ιδιαίτερα χρήσιμη θεραπεία για δερματικές αλλοιώσεις και για βλάβες της κεφαλής, του λαιμού και της στοματικής κοιλότητας [14]
- Μπορεί να εφαρμοστεί πριν ή μετά από τις συμβατικές θεραπείες, χωρίς να τις επηρεάζει [14]
- Μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, χωρίς κίνδυνο [14]

- Παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό αποτελεσματικότητας [13], ιδιαίτερα σε όγκους
 πρώιμου σταδίου [5]
- Μπορεί να παρατείνει την επιβίωση του ασθενούς και να βελτιώσει σημαντικά τη ποιότητα ζωής του σε όγκους προχωρημένου σταδίου [5]
- Είναι ιδανική για την επιτυχή θεραπεία του πρώιμου γαστρεντερικού καρκίνου [5]
- Είναι ιδανική για δύσκολα προσβάσιμους όγκους που διαφορετικά θα απαιτούνταν εκτεταμένη χειρουργική επέμβαση [15]
- Είναι ιδανική για θεραπεία βακτηρίων ανθεκτικών στα φάρμακα [13]
- Μπορεί να εφαρμοστεί εκτός νοσοκομείου [15]
- Χρησιμοποιεί φωτοευαισθητοποιητές που δεν συσσωρεύονται στον πυρήνα των κυττάρων, οπότε δεν προκαλούνται αλλοιώσεις στο DNA [15]
- Το κόστος της θεραπείας είναι χαμηλό, συγκρινόμενο με το κόστος των υπολοίπων συμβατικών θεραπειών καρκίνου [15]

Πέρα όμως από τα πλεονεκτήματα, η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα, τα οποία είναι πολύ σημαντικά, καθώς λόγω αυτών αποφεύγεται η συστηματική χρήση της. Κάποια από αυτά είναι τα εξής:

- Παρά την πρόοδο της τεχνολογίας και της έρευνας για καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του όγκου και τον σχεδιασμό νέων γενεών φωτοευαισθητοποιητών, πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν με ορισμένες εξαιρέσεις, ότι υπάρχουν μικρές διαφορές στα αποτελέσματα της θεραπείας συγκριτικά με τα παλιότερα χρόνια που δεν είχε εξελιχθεί η τεχνολογία [5]
- Ο αριθμός των νέων κλινικά εγκεκριμένων φαρμάκων είναι πολύ μικρός [5]
- Ακατόρθωτη η θεραπεία όγκων σε μεγάλο βάθος ή εσωτερικών οργάνων,
 καθώς το φως δε μπορεί να διεισδύσει και να ενεργοποιήσει το φωτοευαισθητοποιητή [14]
- Η παραμένουσα φωτοευαισθησία στους ασθενείς μετά τη θεραπεία, λόγω
 της φωτοευαίσθητης ουσίας, καθώς ελλοχεύει κίνδυνος ενεργοποίησης της
 ουσίας με την έκθεση στο ηλιακό φως [14]

Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι υδρόφοβοι και ελάχιστα υδατοδιαλυτοί, γεγονός που κάνει ιδιαίτερα δύσκολη τη χορήγησή τους.
 Ακόμα και ορισμένοι με αυξημένη διαλυτότητα στο νερό παρουσιάζουν ανεπαρκή επιλεκτικότητα συσσώρευσης στον στόχο [6]

Παρόλο που τα μειονεκτήματα είναι συγκριτικά λιγότερα από τα πλεονεκτήματα, είναι πολύ σημαντικά και πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη και πρόοδος της θεραπείας αυτής για να αποτελέσει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία. Αυτό θα επιτευχθεί με την βελτίωση τόσο των φωτοευαισθητοποιητών, ώστε να αποφευχθεί η φωτοευαισθησία των ασθενών, όσο και με την βελτίωση του τρόπου ακτινοβόλησης, ώστε το φως να μπορεί να φτάσει σε μεγαλύτερο βάθος.

1.4 Μηχανισμοί φωτοδυναμικής δράσης

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην αλληλεπίδραση τριών στοιχείων: του φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου. Ωστόσο, καθένα από αυτά τα τρία στοιχεία μεμονωμένο δεν έχει καμία επίδραση στον ιστό -στόχο και δεν εμφανίζει θεραπευτικό ή άλλο αποτέλεσμα. Για να προκληθεί ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων και ιστών εμπλέκονται μια σειρά από φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες [13], οι οποίες αναλύονται παρακάτω και απεικονίζονται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2: Φωτοφυσικοί και φωτοχημικοί μηχανισμοί στη φωτοδυναμική θεραπεία [5]

1.4.1 Φωτοφυσική δράση

Η θεμελιώδης κατάσταση (S₀) του φωτοευαισθητοποιητή αποτελείται από δύο ηλεκτρόνια τα οποία έχουν αντιπαράλληλα spin στο μοριακό τροχιακό χαμηλής ενέργειας. Αφού ακτινοβοληθεί το πάσχον σημείο και απορροφηθούν τα φωτόνια, ένα από τα ηλεκτρόνια του φωτοευαισθητοποιητή οδηγείται στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (S₁), δηλαδή σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας, διατηρώντας ωστόσο το spin του. Αυτή η κατάσταση είναι πολύ ασταθής και διαρκεί μερικά νανοδευτερόλεπτα. Έπειτα, είτε θα αποδιεγερθεί στην βασική κατάσταση, χάνοντας ενέργεια μέσω φθορισμού ή μέσω της εσωτερικής μετατροπής της ενέργειας σε θερμότητα, ή εναλλακτικά, θα μεταβεί στην τριπλά διεγερμένη κατάσταση (T₁) έχοντας όμως παράλληλο spin. Η τελευταία κατάσταση διαρκεί μερικά μικροδευτερόλεπτα, γι' αυτό επιτρέπεται η αλληλεπίδραση του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή με τα περιβάλλοντα μόρια [5], [7], [12], [16].

1.4.2 Φωτοχημική δράση

Ο φωτοευαισθητοποιητής που βρίσκεται στην τριπλά διεγερμένη κατάσταση, μπορεί να υποβληθεί σε δύο είδη αντιδράσεων, τύπου Ι και τύπου ΙΙ, οι οποίοι αναλύονται στη συνέχεια.

1.4.2.1 Αντιδράσεις τύπου Ι

Στην τύπου Ι αντίδραση, το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στην τριπλά διεγερμένη στάθμη, μπορεί να αντιδράσει άμεσα με ένα μόριο υποστρώματος ή την κυτταρική μεμβράνη, και να μεταφέρει ένα πρωτόνιο ή ένα ηλεκτρόνιο για να σχηματίσει ελεύθερες και ιοντικές ρίζες. Αυτές, μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω με το μοριακό οξυγόνο, ώστε να παραχθούν δραστικές μορφές οξυγόνου [7], [16]. Συχνά όμως, οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν αρχική παραγωγή ανιόντος υπεροξειδίου μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από την τριπλά διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή στο μοριακό οξυγόνο. Το υπεροξείδιο δεν προκαλεί από μόνο του οξειδωτική καταστροφή, αλλά μπορεί να αντιδράσει με τον εαυτό του και να παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου και του οξυγόνου. Η ύπαρξη του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι απαραίτητη στα βιολογικά συστήματα επειδή μπορεί να διαπεράσει εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και να παραμείνει στα κύτταρα. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό για τη λειτουργία πολλών ενζύμων, συνεπώς και για την υγεία [7].

1.4.2.2 Αντιδράσεις τύπου ΙΙ

Σε μια αντίδραση τύπου ΙΙ, ο φωτοευαισθητοποιητής από την τριπλά διεγερμένη κατάσταση μπορεί να μεταφέρει την ενέργειά του απευθείας στο μοριακό οξυγόνο που βρίσκεται στην θεμελιώδη κατάσταση για να σχηματίσει το κυτταροτοξικό μονήρες οξυγόνου [7], [16], και να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση. Το μονήρες οξυγόνου βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση και μπορεί να αντιδράσει άμεσα με πολλά βιολογικά μόρια. Αν και όλα τα κύτταρα έχουν την ικανότητα αποκατάστασης της οξειδωτικής βλάβης, στις πρωτεΐνες και το DNA, η υπερβολική βλάβη μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις ή κυτταρικό θάνατο. Λόγω της αυξημένης δραστικότητας, το μονήρες οξυγόνο και υδροξύλιο έχουν μικρό χρόνο ημιζωής. Ενδεικτικά, ο χρόνος ημιζωής του μονήρους οξυγόνου σε βιολογικό συστήματα είναι <40 ns, και η ακτίνα δράσης είναι της τάξης του 20 nm. Συνεπώς, μόνο τα μόρια και οι δομές που βρίσκονται κοντά στη περιοχή εντοπισμού του φωτοευαισθητοποιητή επηρεάζονται άμεσα από τη φωτοδυναμική θεραπεία, καθιστώντας τη συγκεκριμένη θεραπεία πολύ επιλεκτική με ελάχιστες παρενέργειες για τους υγιείς παρακείμενους ιστούς [7].

Τόσο ο τύπος Ι όσο και ο τύπος ΙΙ μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα και η αναλογία μεταξύ αυτών των αντιδράσεων εξαρτάται από τον τύπο του φωτοευαισθητοποιητή, τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του οξυγόνου [7]. Ενώ είναι αποδεκτό ότι κυριαρχούν οι διεργασίες της αντίδρασης τύπου ΙΙ και ότι το απλό οξυγόνο είναι ο κύριος κυτταροτοξικός παράγοντας, οι αντιδράσεις τύπου Ι γίνονται πιο σημαντικές σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου ή σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ωστόσο, και οι δύο τύποι αντιδράσεων οδηγούν σε παρόμοια οξειδωτική βλάβη και σε συγκρίσιμες αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών παρουσία οξυγόνου [12].

1.4.3 Φωτοβιολογική δράση

Πέρα όμως από τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές δράσεις, προκαλούνται και οι φωτοβιολογικές. Η διαδικασία της καταστροφής των νεοπλασματικών κυττάρων επηρεάζεται λόγω της πολυπλοκότητας των βιολογικών συστημάτων, κυρίως όταν ο κυτταρικός θάνατος προέρχεται από νέκρωση ή απόπτωση [12]. Οι βλάβες που προκαλούνται στα υποκυτταρικά οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi, μπορούν να προκαλέσουν ενδοκυτταρικές βιολογικές αντιδράσεις και να οδηγήσουν σε ορισμένες μη αναστρέψιμες βλάβες [13].

Τα καρκινικά κύτταρα χρειάζονται συχνά περισσότερα θρεπτικά συστατικά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά για τον γρήγορο μεταβολισμό και τον πολλαπλασιασμό τους, και τα αιμοφόρα αγγεία είναι οι κύριοι πόροι τους [13]. Έτσι, η ακριβής μέθοδος καταστροφής του όγκου, εξαρτάται από τους φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται, καθώς οι περισσότεροι προκαλούν νέκρωση του όγκου μέσω βλάβης του αγγειακού συστήματος. Γι' αυτό, η γνώση των βιολογικών επιπτώσεων που κρύβονται πίσω από τον κυτταρικό θάνατο μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή του ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή για τη θεραπεία μιας δεδομένης ασθένειας [12].

1.5 Μηχανισμοί καταστροφής κυττάρων

Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των δραστικών μορφών οξυγόνου με τους διάφορους βιολογικούς στόχους [10]. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επηρεαστεί από τη συγκέντρωση του οξυγόνου, τη συγκέντρωση, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη θέση εντοπισμού του φωτοευαισθητοποιητή, το κατάλληλο μήκος κύματος και την ένταση του φωτός, καθώς κι από τον τύπο των κυττάρων [16], [17]. Επιπλέον, μπορεί να συμβεί με τρείς διαφορετικούς μηχανισμούς: την απόπτωση, τη νέκρωση και την αυτοφαγία, οι οποίοι αναλύονται στη συνέχεια [5].

1.5.1 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και πραγματοποιείται όταν χρησιμοποιείται ακτινοβολία χαμηλής έντασης [8], [16]. Θεωρείται μια πολύπλοκη φυσική διαδικασία, η οποία όμως καθορίζει την κατάλληλη λειτουργία του σώματος μέσω της αποβολής των ανεπιθύμητων κυττάρων χωρίς την πρόκληση διαταραχών ή φλεγμονών και η οποία κωδικοποιείται γενετικά σε κάθε κύτταρο ξεχωριστά [10], [18]. Μπορεί να συμβεί τόσο σε όγκους όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα καθώς και σε πολλά είδη βακτηρίων [8] τα οποία είναι μεμονωμένα και περιβάλλονται συνήθως από υγιή κύτταρα [16]. Η διαδικασία ξεκινάει είτε μέσω της ενεργοποίησης των κυτταρικών υποδοχέων θανάτου είτε μέσω της μιτοχονδριακής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c. Ωστόσο και τα δύο γεγονότα ενεργοποιούν τις κασπάσες [18]. Μορφολογικά (σχήμα 3), η διαδικασία χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση της χρωματίνης, κατακερματισμό του πυρήνα του κυττάρου και του DNA, συρρίκνωση των κυττάρων, δημιουργία προεξοχών της κυτταρικής μεμβράνης και σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων χωρίς ωστόσο να διασπάται η μεμβράνη. Συνήθως, τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σήματα «βρες με» και «φάε με» που απαιτούνται για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων κυτταρικών συστατικών από τα φαγοκύτταρα [5]. Ο χρόνος που απαιτείται για την έναρξη της απόπτωσης ποικίλλει, με τα περισσότερα κύτταρα να οδηγούνται στο θάνατο άνω του 80% ενός κυτταρικού πληθυσμού σε 1-3 ημέρες [9].



Σχήμα 3: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της απόπτωσης [19]

1.5.2 Νέκρωση

Η νέκρωση των κυττάρων πραγματοποιείται βίαια και γρήγορα στα κύτταρα μεγάλων πληθυσμών [16]. Πρόκειται για μία μη προγραμματισμένη διαδικασία, δηλαδή για ένα βίαιο κυτταρικό θάνατο (σχήμα 4), που προκαλείται από τη βλάβη που προέρχεται από φυσικό ή χημικό τραυματισμό [16]. Συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται υψηλή ένταση ακτινοβολίας ή υψηλή συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή [8], [16]. Συνοδεύεται από διόγκωση του κυτταροπλάσματος, καταστροφή των οργανιδίων και ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. Έπειτα, απελευθερώνονται ενδοκυτταρικά συστατικά, ενώ ταυτόχρονα δημιουργείται φλεγμονή [17], [18]. Στη νέκρωση, η αποσύνθεση συμβαίνει λόγω πρωτεολυτικής δραστικότητας, αλλά οι ακριβείς ταυτότητες των πρωτεασών και των υποστρωμάτων τους είναι ελάχιστα καθορισμένες [17], [18]. Ακόμη, σχετίζεται με αύξηση της συγκέντρωσης Ca⁺² στο κυτταρόπλασμα και μείωση της ουσίας τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) [10]. Η βιοχημεία της χαρακτηρίζεται κυρίως από τη μη ενεργοποίηση της κασπάσης, την απελευθέρωση κυτοχρώματος c, και την καταστροφή του DNA [5].



Σχήμα 4: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της νέκρωσης [20]

1.5.3 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός κυτταρικού θανάτου, κατά τον οποίο το κύτταρο διατηρεί μία ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης, της αποδόμησης και της ανακύκλωσης των κυτταρικών του συστατικών [18] (σχήμα 5). Τα συστατικά αυτά, περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη σχηματίζοντας αυτοφαγόσωμα [5], [10]. Έτσι, δημιουργείται ένα κυστίδιο που διαχωρίζει το περιεχόμενό του [18], και δεσμεύει τα συστατικά του κυτταροπλάσματος καθώς και τα οργανίδια και τα μεταφέρει στα λυσοσώματα. Μετά τη συγχώνευση του λυσοσώματος με το αυτοφαγόσωμα, το περιεχόμενό του αποδομείται από τις λυσοσωμικές υδρολάσες [10], [18].

Με αυτόν τον τύπο κυτταρικού θανάτου, τα κύτταρα επιβιώνουν από διάφορα σήματα «άγχους» όπως είναι το οξειδωτικό στρες, καθώς και μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία [5]. Δεν είναι ακόμη σαφές πώς η αυτοφαγία επηρεάζει το αποτέλεσμα της φωτοδυναμικής θεραπείας, ωστόσο τα κύτταρα χρησιμοποιούν αυτόν τον μηχανισμό για να αμυνθούν από τη βλάβη που προκαλείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, και να καθαριστούν από τα κατεστραμμένα οργανίδια [18].



Σχήμα 5: Διαδικασία του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου της αυτοφαγίας [21]

Κεφάλαιο 2°: Φωτοευαισθητοποιητές

2.1 Χαρακτηριστικά Φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές είναι χημικές ενώσεις που έχουν την ικανότητα να απορροφούν ακτινοβολία ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και να παράγουν θανατηφόρα κυτταροτοξικά προϊόντα. Υπάρχουν εκατοντάδες φυσικές και συνθετικές χρωστικές ουσίες που μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαισθητοποιητές για τη φωτοδυναμική θεραπεία.

Το βασικό χαρακτηριστικό ενός ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή είναι η ικανότητά του να συγκεντρώνεται σε καρκινικούς ιστούς, σε σχέση με τους υγιείς και στη συνέχεια να δημιουργεί κυτταροτοξικούς παράγοντες ώστε να επέλθει ο επιθυμητός κυτταρικός θάνατος, χωρίς να επηρεάζονται τα υγιή κύτταρα [12]. Ακόμη, οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να έχουν χαμηλά επίπεδα τοξικότητας απουσία φωτός και να μην προκαλούν κάποια αλλεργική αντίδραση, υπόταση ή παρενέργειες στον ασθενή [7]. Ιδανικά, οι φωτοευαισθητοποιητές θα πρέπει να απορροφούν την ακτινοβολία που αντιστοιχεί στο κόκκινο μήκος κύματος, ώστε να είναι μεγαλύτερο το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας και να έχουν σχετικά υψηλές ζώνες απορρόφησης, για να ελαχιστοποιείται η δόση του κατά την θεραπεία. Η σύνθεσή τους θα πρέπει να είναι εύκολη και τα υλικά από τα οποία αποτελούνται να είναι άμεσα διαθέσιμα στην αγορά, ώστε να μπορεί να υπάρξει μεγάλη παραγωγή με χαμηλό κόστος. Ακόμη, ένας φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι μια καθαρή χημική ένωση [5], [7], [16] με σταθερή σύνθεση και σταθερή διάρκεια ζωής. Ιδανικά θα πρέπει να είναι υδατοδιαλυτός ή διαλυτός σε ένα αβλαβές υδατικό μίγμα. Η εκκαθάριση του φωτοευαισθητοποιητή από το σώμα του ασθενούς θα πρέπει να είναι γρήγορη [7], [16], δηλαδή να γίνεται σε λιγότερο από μία ημέρα για να μη χρειάζεται ο ασθενής να προστατευτεί από το φως λόγω των φωτοτοξικών παρενεργειών που μπορούν να προκληθούν [5], [7]. Ο πόνος κατά τη θεραπεία είναι ανύπαρκτος ή ανεκτός [22], καθώς η φωτοδυναμική θεραπεία συνήθως δεν απαιτεί αναισθησία ή βαριά καταστολή [7]. Τέλος, σε πολλούς φωτοευαισθητοποιητές, η ενέργεια του φωτός που απορροφάται μπορεί να απελευθερωθεί με μία διαδικασία που ονομάζεται φθορισμός, ο οποίος είναι χρήσιμος γιατί επιτρέπει την απεικόνιση

του στόχου, και συνεπώς την βελτίωση της στόχευσης της φωτοδυναμικής θεραπείας [22].

2.2 Κατηγορίες Φωτοευαισθητοποιητών

Οι φωτοευαισθητοποιητές κατηγοριοποιούνται σε τρεις γενιές, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικές φωτοχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες μεταξύ τους, όσον αφορά τους μηχανισμούς δράσης και ενεργοποίησης του φωτός και παρουσιάζονται παρακάτω [16].

2.2.1 Φωτοευαισθητοποιητές 1^{ης} γενιάς

Ο πρώτος φωτοευαισθητοποιητής που μελετήθηκε λεπτομερώς ήταν ένα σύνθετο μίγμα πορφυρινών, το παράγωγο της αιματοπορφυρίνης [23] που ονομάστηκε Photofrin [7] και στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η δομή του. Αποτελεί σχηματισμό ενός σύνθετου μίγματος μονομερών, διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης [8] με συνδέσεις εστέρα και αιθέρα [12]. Ο φωτοευαισθητοποιητής είχε εγκριθεί σε πολλές χώρες για τη χρήση του σε προχωρημένους και πρώιμου σταδίου καρκίνους, όπως είναι των πνευμόνων, του επιφανειακού καρκίνου του στομάχου, αδενοκαρκίνωμα του οισοφάγου, γαστρικού καρκίνου, καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης [7], [12]. Τα πλεονεκτήματά του είναι ότι καταστρέφει τους όγκους αποτελεσματικά και μπορεί να διαμορφωθεί εύκολα σε ένα υδατοδιαλυτό περιβάλλον με ενδοφλέβια χορήγηση. Το συγκεκριμένο φάρμακο έχει χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες ασθενείς για περισσότερα από 40 χρόνια.

Παρά όμως την αποτελεσματικότητά του, αποδείχθηκε εξαιρετικά αποθαρρυντικό για τους επιστήμονες που προσπάθησαν να προσδιορίσουν τη χημική του δομή και τα συστατικά του. Επιπλέον, διαθέτει και τα εξής μειονεκτήματα:

- Λόγω της μη σταθερής σύνθεσης του μίγματος υπήρξε σημαντική διακύμανση στα αποτελέσματα της θεραπείας μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων του φαρμάκου [7]
- Έχει προκαλέσει παρατεταμένη φωτοευαισθησία του δέρματος

- Δεν εμφανίζει επιλεκτικότητα μόνο σε καρκινικούς ιστούς, αλλά και σε υγιείς
- Ο χρόνος μεταξύ της χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή και της ακτινοβόλησης είναι συνήθως 48-72 ώρες, κατά τη διάρκεια της οποίας ο ασθενής δεν πρέπει να εκτίθεται στο ηλιακό φως [23]
- Η απορρόφηση στα 630 nm είναι χαμηλής έντασης, κατά συνέπεια η διείσδυση της ακτινοβολίας στο ανθρώπινο σώμα είναι περιορισμένη, οπότε η χρήση του φαρμάκου χρησιμοποιείται για επιφανειακούς όγκους [13], [24]
- Εμφανίζει μικρό συντελεστή μοριακής απορρόφησης στα 630 nm (ε_{max} στα 630 nm 3000 M⁻¹ cm⁻¹)
- Οι χρόνοι θεραπείας είναι σχετικά μεγάλοι [22]

Λόγω των παραπάνω μειονεκτημάτων, ήταν απαραίτητη η αναζήτηση νέων φωτοευαισθητοποιητών, οι οποίοι ονομάστηκαν φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς και παρουσιάζονται παρακάτω [12].



Photofrin $R = CH_3CHOH$ or CH_2CH

Σχήμα 6: Δομή Photofrin [12]

2.2.2 Φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς

Κανένας φωτοευαισθητοποιητής δε μπορεί να θεωρηθεί ιδανικός για όλες τις πιθανές εφαρμογές. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί μια σειρά δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητών για να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι φωτοευαισθητοποιητές της 1^{ης} γενιάς [12]. Οι κυριότεροι φωτοευαισθητοποιητές είναι οι εξής:

5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA)

Ο συγκεκριμένος φωτοευαισθητοποιητής αποτελεί ένα προφάρμακο και παρουσιάζει επιτυχή επιλεκτικότητα σε καρκινικούς ιστούς. Διατίθεται στο εμπόριο με το όνομα Levulan, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τοπικά, από το στόμα ή με ενδοφλέβια ένεση. Η ακτινοβόληση πραγματοποιείται με φως μήκους κύματος στα 630 nm, 4-6 ώρες μετά την χορήγησή του. Όμως, ένα από τα μειονεκτήματά του είναι ότι δεν διεισδύει η ακτινοβολία στο δέρμα πολύ βαθιά [8], [12], [13]. Είναι εγκεκριμένο για τη θεραπεία διάφορων καρκίνων και δερματολογικών παθήσεων, όπως είναι η ψωρίαση, η ακμή και η ασθένεια Bowen [13], [24]. Ακόμη, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση όγκων στο δέρμα, στους πνεύμονες, στην ουροδόχο κύστη και στο γαστρεντερικό σύστημα, και για τη θεραπεία των όγκων σε κεφάλι, αυχένα, ουροδόχου κύστης και καρκίνο του προστάτη [13], [22].

Βερτεπορφίνη

Η βερτεπορφίνη αποτελεί παράγωγο της βενζοπορφυρίνης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, του καρκίνου του δέρματος που δεν αφορά το μελάνωμα, της ψωρίασης και της ρευματοειδής αρθρίτιδας. Είναι υδρόφοβη και μεταφέρεται με λιποσώματα. Η ακτινοβόληση πραγματοποιείται με μήκος κύματος στα 690 nm, φθάνοντας σε βέλτιστη αναλογία όγκου-φυσιολογικού ιστού μέσα σε 30-150 λεπτά μετά την ενδοφλέβια χορήγησή του. Τέλος, αποβάλλεται γρήγορα από το σώμα του ασθενούς με αποτέλεσμα η φωτοευαισθησία του δέρματος να διαρκεί μόνο λίγες ώρες [12], [13].

• Τεμοπορφίνη

Η Τεμοπορφίνη διαθέτει την εμπορική ονομασία Foscan και είναι μέλος της οικογένειας των χλωρίνων. Το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησής του είναι τα 652 nm και ο χρόνος που απαιτείται για τη θεραπεία είναι μόνο λίγα λεπτά. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορεί να εμφανιστεί πόνος στον ασθενή. Η επιτυχία του φωτοευαισθητοποιητή παρατηρήθηκε κυρίως σε όγκους χειλιών και

18

στοματικής κοιλότητας, καθώς και στον καρκίνου του οισοφάγου [22]. Θα μπορούσε να είναι ένας από τους πιο φωτοτοξικούς ευαισθητοποιητές της δεύτερης γενιάς, καθώς κατά τη θεραπεία απαιτείται πολύ χαμηλή δόση του και μια ασυνήθιστα χαμηλή δόση ακτινοβολίας, καθιστώντας το 100 φορές πιο αποδοτικό από το Photofrin [12]. Μετά τη θεραπεία όμως, οι ασθενείς πρέπει να παραμείνουν σε σκοτεινό δωμάτιο για 24 ώρες για να αποφευχθεί τυχόν φωτοευαισθησία στο δέρμα [8].

• Τεξαφυρίνες

Οι Τεξαφυρίνες με εμπορική ονομασία Lutrin, έχουν ως κύριο πλεονέκτημά τους την ισχυρή απορρόφησή τους σε μήκος κύματος που αντιστοιχεί στα 732 nm. Έτσι, η θεραπεία μπορεί να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά σε μεγαλύτερο όγκο ή ακόμα και σε μεγαλύτερο βάθος [12].

Φθαλοκυανίνες

Οι δομές τους είναι παρόμοιες με αυτές της πορφυρίνης και περιλαμβάνουν ένα άτομο στο κέντρο που είναι συνήθως ψευδάργυρος, πυρίτιο ή αλουμίνιο και έχουν μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή των 670 nm. Οι φθαλοκυανίνες, συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια και προκαλούν την απόπτωση των κυττάρων. Το σώμα του ασθενούς μπορεί να τις αποβάλλει σε περίπου 24 ώρες, ενώ η θεραπεία μπορεί να ξεκινήσει μία ώρα μετά την χορήγησή τους [22].

Η προσθήκη ενός δεύτερου δακτυλίου βενζολίου στην περιφέρεια της φθαλοκυανίνης δημιουργεί τις ναφθαλοκυανίνες. Αυτές οι ενώσεις απορροφούν σε μήκος κύματος που αντιστοιχεί στα 770 nm, αυξάνοντας έτσι το θεραπευτικό βάθος τους [12].

Ροδαμίνες

Λόγω της πρόσληψής τους από τα μιτοχόνδρια και τη χρήση τους ως ανιχνευτές φθορισμού, οι ροδαμίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φωτοευαισθητοποιητές. Απορροφούν περίπου στο μήκος κύματος των 500 nm, όπου η διείσδυση της ακτινοβολίας στον ιστό είναι ελάχιστη. Παρόλα αυτά, έχουν αποδειχθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματικές [12].

Πορφυκένια
Η παρουσία των τεσσάρων πλευρικών αλυσίδων β-μεθοξυαιθυλίου επιταχύνει τη πρόσληψή τους από τα κύτταρα, ενώ η ακετοξυ-ομάδα αυξάνει τη διαλυτότητα και την υδρόφιλη ικανότητά τους. Αυτή η ένωση μπορεί να εφαρμοστεί τοπικά, καθιστώντας τη χρήσιμη για δερματολογικές εφαρμογές [12].

Λουτρίνη / τεξαφυρίνη

Ανήκει στους υδρόφιλους φωτοευαισθητοποιητές και χορηγείται με ενδοφλέβια ένεση. Η ακτινοβόλησή του πραγματοποιείται στα 732 nm, καθιστώντας το ιδανικό για βαθιά διείσδυση του φωτός στους ιστούς. Αποβάλλεται από τον οργανισμό μετά από μία ημέρα [22].

Padoporfin / padeliporfin

Και οι δύο φωτοευαισθητοποιητές είναι παράγωγα της βακτηριοχλωροφύλλης. Το Padoporfin (Tookad) είναι υδρόφοβο και χρειάζεται έναν μεταφορέα, ενώ το padeliporfin είναι υδρόφιλο. Η φωτοευαισθησία στους ασθενείς παραμένει για τρεις ώρες, και η ενεργοποίησή τους γίνεται στα 763 nm. Ο Tookad είναι ιδιαίτερα δημοφιλής για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη [22].

Πουρπουρίνη

Το μέγιστο της απορρόφησής της είναι στα 660 nm. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητά της στη θεραπεία του καρκίνου του δέρματος, του καρκίνου του μαστού και το σάρκωμα Kaposis [22].

2.2.3 Φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς

Κάποια μειονέκτημα των φωτοευαισθητοποιητών της 2^{ης} γενιάς είναι ότι είναι υδρόφοβοι [6], με αποτέλεσμα να μπορούν να επηρεαστούν οι φωτοφυσικές, φωτοχημικές και φωτοβιολογικές τους ιδιότητες και δεν εντοπίζονται βέλτιστα στους καρκινικούς όγκους [24], [25]. Έτσι, ήταν σημαντικό να αναπτυχθούν οι φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς, οι οποίοι αποτελούν σύζευξη των ήδη υπαρχόντων φωτοευαισθητοποιητών με μόρια-φορείς [24], ώστε να περιβάλλου,

αποτρέποντας έτσι τη συσσωμάτωση τους στο αίμα και ελαχιστοποιώντας τον εντοπισμό τους σε υγιείς ιστούς [25]. Τα μόρια-φορείς μεταξύ των άλλων μπορούν να είναι λιποσώματα, μικκύλια, κεραμικά νανοσωματίδια, νανοσωματίδια χρυσού και νανοσωματίδια πολυμερών και παρουσιάζονται παρακάτω [24].

Τα **λιποσώματα** είναι κολλοειδή σφαιρικά σωματίδια που αποτελούνται από φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες [6]. Αποτρέπουν τη συσσωμάτωση των φωτοευαισθητοποιητών σε υδατικό περιβάλλον [25] και είναι ικανά να μεταφέρουν τόσο υδρόφοβα, όσο και υδρόφιλα φάρμακα. Τέλος, μπορούν να βελτιστοποιήσουν την επιλεκτικότητα των φωτοευαισθητοποιητών στους πάσχοντες ιστούς [24].

Τα *μικκύλια* είναι κολλοειδή σφαιρικά μόρια, στα οποία οι υδρόφιλες περιοχές της κεφαλής έρχονται σε επαφή με τον περιβάλλοντα διαλύτη και οι υδρόφοβες ουρές τους βρίσκονται στον πυρήνα. Το μέγεθος των σωματιδίων αυτών είναι συνήθως 5– 100 nm. Χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά υδρόφοβων ευαισθητοποιητών, φυσικώς εγκλωβισμένων ή συνδεδεμένων ομοιοπολικά στον υδρόφοβο πυρήνα τους [25], [26].

Τα **δενδριμερή** είναι νανοσωματίδια πολυμερών με πολλές διακλαδώσεις. Αποτελούνται από έναν εσωτερικό πυρήνα και τις διακλαδώσεις που μπορούν να συζευχθούν με τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή. Έτσι, πραγματοποιείται η βέλτιστη κυτταρική πρόσληψη του φαρμάκου [24], [25].

Οι *νανοσωλήνες άνθρακα* είναι δομές που συντίθενται με έλαση φύλλων άνθρακα σε κοίλους σωλήνες με ένα τοίχωμα, διπλό τοίχωμα ή πολλαπλά τοιχώματα. Οι διαλυτοποιημένοι νανοσωλήνες δεν παρουσιάζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, η μακροχρόνια χρήση τους μπορεί να ενέχει κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου [24].

Μια κατηγορία νανοϋλικών άνθρακα είναι και τα *φουλλερένια*. Αυτά, έχουν μοναδικές φωτοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες και το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό, ελλειψοειδές ή σωληνοειδές. Επιπλέον, με τη χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν, είναι ιδανικά για τη μεταφορά φαρμάκων σε καρκινικούς όγκους [27]. Ωστόσο, επειδή είναι υδρόφοβα [28], περιορίζεται η χρήση τους γιατί δε μπορούν να συσσωρευτούν στους καρκινικούς όγκους [27].

21

Τα *νανοσωματίδια χρυσού* έχουν μελετηθεί εκτενώς [6] λόγω της βιοσυμβατότητάς τους και της χαμηλής τους τοξικότητας. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι είναι ιδανικοί για την μεταφορά των φωτοευαισθητοποιητών, καθώς ο συνδυασμός τους έχει πολλά πλεονεκτήματα [29].

Κεφάλαιο 3°: Κουρκουμίνη

3.1 Εισαγωγή

Η κουρκουμίνη είναι μία δραστική ουσία με χρυσό-κίτρινο χρώμα, που προέρχεται από την ρίζα του φυτού Curcuma longa (σχήμα 7), γνωστό ως κουρκουμά. Το φυτό χρησιμοποιούνταν κυρίως στην Ινδία, για τη θεραπεία ασθενειών, για συστατικό των τροφίμων και ως κίτρινη βαφή στην κλωστοϋφαντουργία, χωρίς κάποιες παρενέργειες. Η κουρκουμίνη (σχήμα 8) που είναι μία υδρόφοβη [30] πολυφαινόλη, απομονώθηκε από το φυτό πριν δύο αιώνες, και η δομή του ως diferuloylmethane καθορίστηκε το 1815. Το φυτό πρωτοεμφανίστηκε στην Ευρώπη τον 13° αιώνα από Άραβες εμπόρους και ονομάστηκε «ινδικό σαφράν» λόγω του χρώματος και της γεύσης του [30], [31], [32].

Το κίτρινο χρώμα του κουρκουμά προέρχεται από τα κουρκουμινοειδή που περιέχει και τα οποία σχετίζονται χημικά με την κουρκουμίνη. Τα κύρια κουρκουμινοειδή είναι η diferuloylmethane (κουρκουμίνη Ι), η demethoxycurcumin (κουρκουμίνη ΙΙ), η bisdemethoxycurcumin (κουρκουμίνη ΙΙΙ) και η πρόσφατα αναγνωρισμένη cyclocurcumin. Η κουρκουμίνη του εμπορίου περιέχει κουρκουμίνη Ι (77%), κουρκουμίνη ΙΙ (18%) και κουρκουμίνη ΙΙΙ (5%). Το σύμπλεγμα κουρκουμινοειδών αναφέρεται επίσης ως Indian saffron, kurkum και yellow ginger [31], [32].



Σχήμα 7: Το φυτό curcuma longa [33]



Σχήμα 8: Η ουσία κουρκουμίνη [34]

3.2 Δομή κουρκουμίνης

Η χημική δομή της κουρκουμίνης (σχήμα 9) είναι 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1, 6-heptadiene-3,5-dione ή αλλιώς diferuloylmethane και αναγνωρίστηκε το 1910 από τους Lampe και Milobedeska. Είναι μια κίτρινη-πορτοκαλί σκόνη που είναι αδιάλυτη σε υδατικούς διαλύτες αλλά διαλυτή σε DMSO, αιθανόλη, μεθανόλη και ακετόνη [32], [35], [36]. Όταν όμως εκτίθεται σε όξινες συνθήκες, το χρώμα της μετατρέπεται από κίτρινο σε βαθύ κόκκινο [31]. Έχει σημείο τήξεως στους 183 °C, μοριακό βάρος 368,37 g/mol [37] και μοριακό τύπο $C_{21}H_{20}O_6$ [32]. Το μέγιστο της απορρόφησής της είναι περίπου στα 420 nm.



Σχήμα 9: Η χημική δομή των κουρκουμινοειδών [37]

3.3 Ιδιότητες και χρήσεις της κουρκουμίνης

Η κουρκουμίνη, παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως καρύκευμα διατροφής, αρωματικός παράγοντας, συντηρητικό τροφίμων, χρωστικός παράγοντας, καλλυντικό ή φάρμακο, καθώς [32], [37] είναι αποδεδειγμένο ότι διαθέτει αντιμικροβιακές, αντιικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες [13], [30], [31], [32].

Έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες έρευνες, οι οποίες έχουν αποδείξει ότι η κουρκουμίνη μειώνει τη χοληστερόλη, προστατεύει από το έμφραγμα του μυοκαρδίου και καταστέλλει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τον διαβήτη τύπου ΙΙ, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα που αφορά κυρίως ηλικιωμένους, τη σκλήρυνση κατά πλάκας, τη νόσο του Πάρκινσον και τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Ακόμη, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του ιού ΗΙV, τον πονόδοντο, τους πόνους που προέρχονται από την εμμηνόρροια, την επούλωση πληγών στο δέρμα και προστατεύει το ήπαρ, τους νεφρούς, την χολή, και τα μάτια από το σχηματισμό καταρράκτη. Έχει αποδειχθεί, ότι μπορεί να θεραπεύσει ασθένειες όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, κολικούς, ψωρίαση και διάφορα αναπνευστικά προβλήματα όπως είναι το άσθμα, οι αλλεργίες, ο βήχας, η ρινική καταρροή και η ιγμορίτιδα [30], [31], [32], [37].

Τέλος, η κουρκουμίνη μπορεί να αποτρέψει και να θεραπεύσει τον καρκίνο, διότι έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό μιας ευρείας ποικιλίας καρκινικών κυττάρων, όπως του καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου, των νεφρών, του ήπατος, του στομάχου, της λευχαιμίας, και του προστάτη. Φαρμακολογικά, η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι είναι ασφαλής και μη τοξική για τον άνθρωπο [32], [37], [38], [39] ακόμη και σε υψηλές δόσεις (12 g / ημέρα) [30], [32].

3.4 Κουρκουμίνη στη Φωτοδυναμική θεραπεία

Н φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου. Κατά τη συνύπαρξη των τριών αυτών στοιχείων, συμβαίνουν διάφορες διεργασίες που τελικό στόχο έχουν τη θανάτωση των πασχόντων κυττάρων. Η κουρκουμίνη παρουσιάζει μία ποικιλία από φαρμακολογικές ιδιότητες [40] και μπορεί να αποτελέσει έναν ιδανικό φωτοευαισθητοποιητή γιατί πληροί πολλά από τα επιθυμητά τους κριτήρια, όπως είναι το χαμηλό κόστος παραγωγής της και η μη τοξικότητά της απουσία φωτός. Ακόμη, δρα αποτελεσματικά ενάντια σε διάφορες ασθένειες, όπως είναι οι καρκινικοί όγκοι και οι στοματικές παθήσεις. Το φασματικό εύρος απορρόφησής της κυμαίνεται μεταξύ 300 nm και 500 nm, και η μέγιστη κορυφή απορρόφησής της είναι στα 430 nm [41], με σχετικά υψηλό συντελεστή απόσβεσης. Η κουρκουμίνη μπορεί να προκαλέσει ισχυρές φωτοτοξικές αντιδράσεις σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις για αυτό αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο φωτοευαισθητοποιητή για τη θεραπεία τοπικών επιφανειακών λοιμώξεων και καρκίνων, παρόλο που ο μηχανισμός φωτοευαισθησίας της δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Η κουρκουμίνη ως παράγοντας φωτοευαισθητοποίησης για τη φωτοδυναμική θεραπεία, έχει αποτελέσει αντικείμενο αρκετών μελετών είτε για την αντιμικροβιακή της δράση είτε σε διάφορα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα [42].

Η φωτοδυναμική θεραπεία που ενεργοποιεί με μπλε φως LED φωτοευαισθητοποιητές όπως είναι η κουρκουμίνη, θα μπορούσε να προσφέρει ένα εξαιρετικό αποτέλεσμα για τη μείωση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών Streptococcus mutans και Lactobacillus acidophilus, που είναι υπεύθυνοι για

27

μολύνσεις, καθώς και της τερηδόνας στις οδοντικές κοιλότητες [43]. Απαραίτητη ήταν η μελέτη της φωτοτοξικότητας της κουρκουμίνης, για αυτό διερευνήθηκαν οι πιθανές φωτοβιολογικές της δράσεις σε βακτήρια Salmonella typhimurium και Escherichia coli. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν εντυπωσιακά, καθώς η κουρκουμίνη, μετά την ακτινοβόλησή της με ορατό φως, προκαλούσε φωτοτοξικότητα στα βακτήρια, ακόμη και με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις [44]. Η φωτοτοξικότητα της κουρκουμίνης μελετήθηκε και σε άλλα βακτήρια και αποδείχθηκε ότι μετά την έκθεσή της σε φως, παρουσίασε φωτοτοξικότητα εξαρτώμενη από το οξυγόνο [45].

Οι μικρομοριακές συγκεντρώσεις (0,4 μM - 13,5 μM) της κουρκουμίνης, σε συνδυασμό με την ακτινοβόληση χαμηλής έντασης, αποδείχθηκαν αποτελεσματικές για τη θεραπεία καρκίνων του στόματος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας σε κύτταρα ηπατοβλαστώματος (HuH6, HepT1) και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HepG2, HC-AFW1), μετά τη θεραπεία τους με κουρκουμίνη και με ακτινοβόληση μπλε φωτός. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε μελέτη των συνθετικών παραγώγων της κουρκουμίνης ως φωτοευαίσθητες ουσίες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης ήταν ότι τα κουρκουμινοειδή παρουσίασαν πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους κατά τη θεραπεία [42].

Κάποιοι από τους περιορισμούς της κουρκουμίνης για τη πιθανή κλινική εφαρμογή της στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι η χαμηλή διαλυτότητά της στο νερό και η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά της. Για αυτό το λόγο δεν έχει ακόμη εγκριθεί ως θεραπευτικός παράγοντας. Αρκετές μελέτες όμως δείχνουν ότι το πρόβλημα της βιοδιαθεσιμότητας μπορεί να επιλυθεί μέσω της συσχέτισης της κουρκουμίνης με λιποσώματα, νανοσωματίδια, σύμπλοκα φωσφολιπιδίων, υαλουρονικό οξύ και νανογαλακτώματα. Συγκεκριμένα, το νανογαλάκτωμα κουρκουμίνης παρήγαγε μία αποτελεσματική φωτοδυναμική απόκριση σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας μόνο στα κύτταρα που είχαν ακτινοβοληθεί, ενώ ένα από τα πιο ενδιαφέροντα αντικαρκινικά αποτελέσματα είναι ότι ο καρκινικός θάνατος συμβαίνει με απόπτωση [46]. Β' Μέρος - Πειραματικό

Κεφάλαιο 4°: Πειραματικές διατάξεις και ουσίες

4.1 Σκοπός της πειραματικής μελέτης

Κάθε φωτοευαισθητοποιητής παρουσιάζει διαφορές σε πολλά από τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητές του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, στη φωτοδυναμική θεραπεία να είναι αναγκαία η μελέτη του κάθε φωτοευαισθητοποιητή πριν από τη χρήση του, ως προς τον προσδιορισμό των φωτοφυσικών του ιδιοτήτων.

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη του νέου συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως πιθανού φωτοευαισθητοποιητή για τη φωτοδυναμική Θεραπεία του καρκίνου. Το νέο αυτό σύμπλοκο μελετήθηκε ως προς τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές του ιδιότητες καθώς και ως προς την φωτοδυναμική του δράση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7 cancer cells). Επίσης σκοπό της εργασίας αποτελεί η συγκριτική μελέτη του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι.

Στη συνέχεια, ο σκοπός εξειδικεύεται και περιλαμβάνει τις ακόλουθες μελέτες για τους δύο φωτοευαισθητοποιητές (σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνη Ι):

- Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες
 συγκεντρώσεις
- Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διάφορους διαλύτες
- Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διαλύματα με διάφορες
 συγκεντρώσεις
- Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο απορρόφησης
- Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο φθορισμού
- Μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών
- Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7) απουσία φωτός (dark toxicity)
- Μελέτη του χωρικού εντοπισμού των ουσιών στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF-7)
- Μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού

4.2 Πειραματικές διατάξεις

4.2.1 Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Για τη μελέτη της απορρόφησης, της φωτολεύκανσης και της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητο ένα φασματοφωτόμετρο απορρόφησης, το οποίο να λαμβάνει και να καταγράφει φάσματα απορρόφησης. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για αυτόν το σκοπό είναι το φασματοφωτόμετρο Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin - Elmer (σχήμα 10), καθώς είναι ένα ευέλικτο όργανο που λειτουργεί στις περιοχές του υπεριώδους και του ορατού φωτός.



Σχήμα 10: Φασματοφωτόμετρο απορρόφησης

Παρακάτω παρατίθεται το οπτικό διάγραμμα του οργάνου και η πορεία που ακολουθεί η φωτεινή δέσμη (σχήμα 11).



Σχήμα 11: Οπτικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου απορρόφησης [47]

Το συγκεκριμένο όργανο διαθέτει δύο πηγές ακτινοβολίας, μια λάμπα δευτερίου και μια λάμπα αλογόνου. Η λάμπα δευτερίου εκπέμπει στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος (200-400 nm), ενώ η λάμπα αλογόνου στην ορατή και κοντινή υπέρυθρη περιοχή (350-900 nm), καλύπτοντας έτσι το εύρος μηκών κύματος λειτουργίας του οργάνου.

Για τη λειτουργία στην ορατή περιοχή του φάσματος, το κάτοπτρο M1 ανακλά την ακτινοβολία που προέρχεται από την λάμπα αλογόνου στο κάτοπτρο M2, εμποδίζοντας ταυτόχρονα την ανάκλαση της ακτινοβολίας που προέρχεται από τη λάμπα δευτερίου. Για τη λειτουργία στη περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, το κάτοπτρο M1 ανυψώνεται για να επιτραπεί η διέλευση της ακτινοβολίας από τη λάμπα δευτερίου στο κάτοπτρο M2. Η αλλαγή της πηγής ακτινοβολίας πραγματοποιείται αυτόματα κατά τη περιστροφή του μονοχρωμάτορα.

Έπειτα, η ακτινοβολία οδηγείται σε έναν τροχό φίλτρου, ο οποίος περιστρέφεται ώστε να παρεμβληθεί στην πορεία της δέσμης το κατάλληλο φίλτρο. Σκοπός του φίλτρου είναι να φιλτράρει τη δέσμη πριν αυτή εισέλθει στο μονοχρωμάτορα, μέσω της σχισμής εισόδου του τελευταίου (σχισμή 1). Ένας βηματικός κινητήρας οδηγεί τον

τροχό των φίλτρων έτσι ώστε αυτός να βρίσκεται σε συγχρονισμό με το μονοχρωμάτορα. Για τη δημιουργία του φάσματος, διασπείρεται η ακτινοβολία στο φράγμα περίθλασης και ανακλάται στο κάτοπτρο M3, αφού περάσει πρώτα από τη σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα (σχισμή 2). Η σχισμή εξόδου περιορίζει το τμήμα του φάσματος σε μια σχεδόν μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας.

Από το κάτοπτρο M3 η ακτινοβολία ανακλάται σε έναν διαχωριστή δέσμης, ο οποίος επιτρέπει το 50% της ακτινοβολίας να περάσει στο κάτοπτρο M4 ενώ το υπόλοιπο 50% να οδηγηθεί στο κάτοπτρο M5. Το κάτοπτρο M4 εστιάζει την ακτινοβολία στο υπό εξέταση δείγμα και στη συνέχεια, μέσω ενός κυρτού φακού περνάει στη φωτοδίοδο (ανιχνευτής). Το κάτοπτρο M5 εστιάζει την ακτινοβολία στο δείγμα αναφοράς και έπειτα μέσω ενός κυρτού φακού περνάει στη φωτοδίοδο. Τα δύο δείγματα (εξέτασης και αναφοράς) βρίσκονται σε όμοιες κυβέττες, οι οποίες εισάγονται στις κατάλληλες υποδοχές που διαθέτει το όργανο (σχήμα 12) [47].



Σχήμα 12: Υποδοχές κυβεττών του οργάνου

Το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης ελέγχεται από τη χρήση του λογισμικού πακέτου UV WinLab, μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή. Με το λογισμικό αυτό είναι εφικτό να ρυθμίζονται κάποιες παράμετροι του οργάνου και της μέτρησης και να εκτελούνται οι εξής διεργασίες:

- Η επιλογή της περιοχής των μηκών κύματος που θα παρθεί το φάσμα απορρόφησης του δείγματος
- Η επιλογή της ταχύτητας σάρωσης και του πλάτους της σχισμής του μονοχρωμάτορα
- Η ικανότητα αφαίρεσης του σήματος του διαλύτη και του θορύβου του οργάνου
- Η ικανότητα εξομάλυνσης (smoothing)
- Η δυνατότητα επεξεργασίας των φασμάτων απορρόφησης που προκύπτουν από τις μετρήσεις

4.2.2 Φασματοφωτόμετρο φθορισμού

Για τη λήψη των φασμάτων φθορισμού, είναι απαραίτητο ένα φασματοφωτόμετρο φθορισμού. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το όργανο Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (σχήμα 13, σχήμα 14), το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό, φωσφορισμό, χημειοφωταύγεια ή βιοφωταύγεια. Στο συγκεκριμένο όργανο είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί λήψη φασμάτων φθορισμού είτε με συνεχή σάρωση σε όλο το εύρος μηκών κύματος του οργάνου, είτε για συγκεκριμένα μήκη κύματος.



Σχήμα 13: Φασματοφωτόμετρο φθορισμού



Σχήμα 14: Θέση υποδοχής της κυβέττας στο φασματοφωτόμετρο



Στη συνέχεια παρουσιάζεται το οπτικό διάγραμμα του οργάνου (σχήμα 15).

Σχήμα 15: Οπτικό διάγραμμα οργάνου [48]

Η πηγή φωτός στο συγκεκριμένο όργανο είναι μια λυχνία ξένου (Xenon flash tube). Η ένταση του παλμού που παράγει είναι μεγάλη, ενώ η χρονική διάρκεια μικρή. Η ακτινοβολία που προέρχεται από την πηγή αρχικά εστιάζεται από το ελλειψοειδές κάτοπτρο M1 και ανακλάται από το τοροειδές κάτοπτρο M2 στην σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα διέγερσης. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα φράγμα περίθλασης, ένα σφαιρικό κάτοπτρο M3 και μια σχισμή εξόδου. Από την τελευταία εξέρχεται η μονοχρωματική ακτινοβολία, με το κεντρικό μήκος κύματός της να καθορίζεται από τη ρύθμιση της θέσης σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από ένα βηματικό κινητήρα.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της δέσμης προσπίπτει στο δείγμα, μέσω ενός τοροειδούς κατόπτρου M5, ενώ το υπόλοιπο εστιάζεται στο φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς. Για να διορθωθεί η απόκριση του φωτοπολλαπλασιαστή αναφοράς, είναι αποθηκευμένη μια καμπύλη διόρθωσης ροδαμίνης στο όργανο, η οποία απορροφά στο εύρος μηκών κύματος 230 nm έως 630 nm και εκπέμπει περίπου στα 650 nm με σχεδόν σταθερή κβαντική απόδοση. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα εστιάζεται από το τοροειδές κάτοπτρο M6 στη σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα εκπομπής, ο οποίος αποτελείται από τη σχισμή εισόδου, ένα σφαιρικό κάτοπτρο M8, ένα φράγμα περίθλασης και τη σχισμή εξόδου. Ομοίως κι εδώ εξέρχεται η μονοχρωματική ακτινοβολία από τη σχισμή εξόδου, με το κεντρικό μήκος κύματός της να καθορίζεται από τη ρύθμιση της θέσης σάρωσης του φράγματος περίθλασης, η γωνία του οποίου ελέγχεται από ένα βηματικό κινητήρα και συγκεντρώνεται στο φωτοπολλαπλασιαστή.

Οι μονοχρωμάτορες διέγερσης και εκπομπής μπορούν να σαρώνουν ανεξάρτητα ή συγχρονισμένα. Τα φασματικά τους εύρη είναι:

• Για το μονοχρωμάτορα διέγερσης: 200 nm έως 800 nm

• Για το μονοχρωμάτορα εκπομπής: 200 nm έως 900 nm [48]

Ο έλεγχος του οργάνου γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού FL WinLab, μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Μπορούν να γίνουν ρυθμίσεις διαφόρων παραμέτρων και να εκτελεστούν οι εξής διεργασίες:

- Η επιλογή του μήκους κύματος διέγερσης, καθώς και το εύρος των μηκών κύματος που θα παρθεί το φάσμα φθορισμού
- Η ικανότητα μηδενισμού του σήματος που προέρχεται είτε από το διαλύτη,
 είτε από το θόρυβο του οργάνου
- Η δυνατότητα επεξεργασίας των φασμάτων φθορισμού που προκύπτουν από τις μετρήσεις

4.2.3 Διάταξη ακτινοβόλησης

Για να πραγματοποιηθούν τα πειράματα που σχετίζονται με τη μελέτη της φωτολεύκανσης, της ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών και της επίδρασης της φωτοδυναμικής θεραπείας του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι, είναι απαραίτητη μία διάταξη ακτινοβόλησης.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε ειδική διάταξη ακτινοβόλησης, η οποία διαφοροποιείται μόνο ως προς την πηγή φωτός για τις δυο προς μελέτη ουσίες. Η

διάταξη αποτελείται από μία φωτεινή πηγή, ειδική υποδοχή για το δείγμα και βάση στήριξης με μαγνητικό αναδευτήρα (σχήμα 16).



Σχήμα 16: Διάταξη ακτινοβόλησης

Το δείγμα τοποθετήθηκε στη κυβέττα μαζί με ένα μαγνήτη. Στη συνέχεια, η κυβέττα τοποθετήθηκε σε μία ειδική υποδοχή σε τέτοια θέση και απόσταση από την πηγή ώστε να δέχεται ομοιόμορφη ακτινοβόληση σε όλα τα σημεία του δείγματος. Στη βάση της ειδικής υποδοχής τοποθετήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας, ο οποίος ενεργοποιεί το μαγνήτη που είναι τοποθετημένος μέσα στη κυβέττα με στόχο την ανάδευση του δείγματος και την ύπαρξη ομοιογένειας σε αυτό κατά την ακτινοβόληση.

Για τη φωτοδιέγερση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμη λάμπα μπλε φωτός αποτελούμενη από 3 led σε κυκλική συμμετρία (σχήμα 17).



Σχήμα 17: Πηγή φωτός για τη φωτεινή ενεργοποίηση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

Πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων ακτινοβόλησης είναι απαραίτητο να μετρηθεί η σχετική ένταση της ακτινοβολίας της πηγής φωτός ως προς το μήκος κύματος. Για το σκοπό αυτό γίνεται χρήση της πηγής, του μονοχρωμάτορα, της αντίστασης και του πολυμέτρου. Καθώς προσπίπτει η ακτινοβολία της πηγής στην είσοδο του μονοχρωμάτορα, αναλύεται. Στην έξοδο από τον μονοχρωμάτορα, επιλέγεται διαδοχικά μια στενή φασματική περιοχή. Η εξερχόμενη μονοχρωματική ακτινοβολία προκαλεί ανάπτυξη της τάσης στην αντίσταση που έχει συνδεθεί, η οποία είναι ανάλογη με την ένταση ακτινοβόλησης. Η μέτρηση της τάσης αυτής γίνεται με το πολύμετρο. Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα της σχετικής έντασης της ακτινοβολίας της πηγής ως προς το μήκος κύματος (σχήμα 18) [15].



Σχήμα 18: Φάσμα εκπομπής της πηγής φωτός για τη διέγερση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

Για την ακτινοβόληση και φωτεινή ενεργοποίηση της Κουρκουμίνης Ι, αναπτύχθηκε πηγή ακτινοβόλησης βασιζόμενη στο Bridgelux Power LED 10W που απεικονίζεται στο σχήμα 19, ενώ στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα τεχνικά του χαρακτηριστικά.



Σχήμα 19: Bridgelux Power LED 10W

Θερμοκρασία Χρώματος	Actinic violet
Μήκος Κύματος	415 – 420 nm
Voltage	11V @ 1A
Radiant Flux	1800 – 2000mW @ 1A
Μέγιστο Φορτίο	1Α (προτεινόμενο)
Γωνία Φακού	120 degrees
Θερμοκρασία Λειτουργίας	-20°C ~ 70°C

Πίνακας 1: Τεχνικά χαρακτηριστικά της πηγής ακτινοβολίας Bridgelux Power LED 10W [15]

Το φάσμα της σχετικής έντασης της ακτινοβολίας της πηγής του φωτός ως προς το μήκος κύματος παρουσιάζεται στο σχήμα 20.



Σχήμα 20: Φάσμα εκπομπής της πηγής φωτός Bridgelux Power LED 10W για τη διέγερση της Κουρκουμίνης Ι [15]

Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός στο επίπεδο του δείγματος μετράται πριν και μετά από κάθε πείραμα με τη βοήθεια ειδικού φωτομέτρου.

4.2.4 Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι στα κύτταρα του μαστού (MCF-7), πραγματοποιήθηκε με το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Germany) (σχήμα 21) και οι εικόνες φθορισμού αποκτήθηκαν με το λογισμικό LAS X software (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany).



Σχήμα 21: Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser

Η αρχή λειτουργίας της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser βασίζεται στο γεγονός ότι η εστίαση της διέγερσης με τη δέσμη του laser και η παρατήρηση πραγματοποιούνται στο ίδιο σημείο, οπότε ο φθορισμός που προκύπτει οφείλεται μόνο σε αυτό το σημείο, γι' αυτό πρέπει κάθε φορά να σαρώνεται ολόκληρο το δείγμα. Ο οπτικός θόρυβος που οφείλεται στον απευθείας φωτισμό του δείγματος αλλά και στο μέσο μειώνεται σημαντικά, χάρη στη τοποθέτηση των ιρίδων.

Παρακάτω παρουσιάζεται η αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser (σχήμα 22).



Σχήμα 22: Αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser [49]

To laser και οι ίριδες πρέπει να είναι εστιασμένες ταυτόχρονα στο ίδιο σημείο του δείγματος. Η δέσμη του laser διέρχεται μέσα από την ίριδα της πηγής και ανακλάται σε ένα διχρωϊκό κάτοπτρο για να εστιαστεί στο δείγμα και να προκαλέσει το φθορισμό του. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός διέρχεται από το διχρωϊκό κάτοπτρο στην ίριδα του ανιχνευτή πριν φτάσει στον ίδιο τον ανιχνευτή, για να δημιουργηθεί η εικόνα φθορισμού που οφείλεται μόνο στις ακτίνες φωτός που προέρχονται από το εστιακό επίπεδο. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται εικόνες μεγάλης ευκρίνειας. Το μήκος κύματος του laser εξαρτάται από τον ιχνηθέτη που έχει εισαχθεί στο δείγμα, καθώς πρέπει να συμπίπτει με τη κορυφή απορρόφησης του ιχνηθέτη. Το μέγεθος της ίριδας καθορίζει το πάχος του εστιακού επιπέδου και τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου γενικότερα [49].

4.3 Ουσίες

4.3.1 Κουρκουμίνη Ι

Η κουρκουμίνη Ι (ή αλλιώς diferuloylmethane) είναι η 1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione και στο σχήμα 23 παρουσιάζεται η χημική της δομή. Πρόκειται για μια κίτρινη-πορτοκαλί σκόνη που είναι αδιάλυτη σε υδατικούς

διαλύτες [32], [35], [36]. Έχει σημείο τήξεως στους 183 °C, μοριακό βάρος 368,37 g/mol [37] και μοριακό τύπο C₂₁H₂₀O₆ [32].



Curcumin I

Σχήμα 23: Η χημική δομή της κουρκουμίνης Ι [37]

4.3.2 Σύμπλοκο Κουρκουμίνης - Γαλλίου

Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου σχεδιάστηκε από την Ερευνήτρια Δρ. Μαρίνα Σαγνού και συντέθηκε από το συνεργαζόμενο ερευνητή Δρ. Ελευθέριο Χαλέβα , στο Εργαστήριο Δομικών Μελετών Βιομορίων και Φαρμάκων με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR), στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Βιοεφαρμογών, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος». Το μοριακό βάρος της είναι 873,47 g/mol.

4.3.3 DMSO

Το DMSO (dimethylsulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο) είναι ένα άχρωμο υγρό που χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα πειράματα σαν διαλύτης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι. Έχει μοριακό τύπο C₂H₆OS και η χημική του δομή παρουσιάζεται στο σχήμα 24 [50].



Σχήμα 24: Η χημική δομή του DMSO [50]

4.3.4 PBS

To PBS (Phosphate Buffered Saline) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων που χρησιμοποιείται συχνά σε βιολογικές εφαρμογές, όπως είναι το πλύσιμο των κυττάρων, καθώς δεν είναι τοξικό για τα κύτταρα. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε τόσο στις κυτταρικές καλλιέργειες όσο και σαν διαλύτης σε κάποια από τα πειράματα [51].

4.3.5 Αιθανόλη

Η αιθανόλη (ethanol, EtOH) είναι ένα εύφλεκτο, πτητικό και άχρωμο υγρό με μοριακό τύπο C₂H₆O ή C₂H₅OH ή CH₃CH₂OH. Η χημική της δομή παρουσιάζεται στο σχήμα 25. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι σε κάποια από τα πειράματα [52], [53].



Σχήμα 25: Η χημική δομή της αιθανόλης [53]

4.3.6 NADH

Το ΝΑD αποτελείται από δύο νουκλεοτίδια που ενώνονται μέσω των φωσφορικών τους ομάδων. Το ένα νουκλεοτίδιο περιέχει μια νουκλεοβάση αδενίνης, ενώ το άλλο ένα νικοτιναμίδιο. Το ΝΑD υπάρχει σε δύο μορφές: μια οξειδωμένη (NAD⁺) και μια μειωμένη (NADH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο). To NADH είναι ένα νουκλεοτίδιο πυριδίνης που λειτουργεί ως οξειδωτικός παράγοντας σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η χημική του δομή παρουσιάζεται στο σχήμα 26.



Σχήμα 26: Η χημική δομή του NADH [54]

Το NADH σχηματίζεται από το NAD⁺ το οποίο δρα ως φορέας ιόντων υδριδίων. Το ιόν αυτό απομακρύνεται ενζυματικά από ένα μόριο του υποστρώματος, εξαιτίας της δράσης αφυδρογονασών. Η αντιστρεπτή μεταφορά ενός ιόντος υδριδίου από την αφυδρογονάση προς το NAD⁺ καταλύεται από τα ένζυμα αυτά, και τελικά σχηματίζεται το NADH (σχήμα 27).



Σχήμα 27: Σχηματισμός NADH από NAD⁺ και αντίστροφα [55]

Τόσο το NAD⁺ όσο και το NADH απορροφούν έντονα το υπεριώδες φως λόγω της ύπαρξης αδενίνης. Η μέγιστη τιμή της απορρόφησής τους είναι σε μήκος κύματος περίπου 260 nm, ενώ το NADH, παρουσιάζει και μια δεύτερη κορυφή στα 340 nm όπως φαίνεται στο σχήμα 28. Με βάση την αύξηση που παρατηρείται στην απορρόφηση κατά τον σχηματισμό του NADH (ή αντίστοιχα της μείωσης κατά το σχηματισμό του NAD⁺) στα 340 nm γίνεται αντιληπτή η δραστηριότητα πολλών ενζύμων και η παραγωγή των ελευθέρων ριζών.



Σχήμα 28: Απορρόφηση των ΝΑD⁺ και ΝΑDΗ σε σχέση με το μήκος κύματος [55]

Στη παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το NADH για τον έλεγχο της παραγωγής των ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι [54], [55], [56], [57].

4.3.7 FBS

To FBS (Fetal Bovine Serum) είναι ένα υγρό βοοειδών που αποτελείται από εμβρυϊκούς παράγοντες και περιέχει μεγάλο αριθμό θρεπτικών και μακρομοριακών παραγόντων, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την καλλιέργεια των κυττάρων. Ο ορός αυτός διατηρείται στην κατάψυξη [59].

4.3.8 Αντιβιοτικό

Το αντιβιοτικό είναι απαραίτητο στις καλλιέργειες των κυττάρων για την αποφυγή τυχόν μολύνσεων που μπορούν να προκύψουν. Είναι ένα ελαφρώς κίτρινο υγρό και διατηρείται στην κατάψυξη. Περιέχει πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και Gibco αμφοτερικίνη Β.

4.3.9 DMEM

To DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) είναι ένα κατάλληλο μέσο για τη καλλιέργεια των κυττάρων, καθώς περιέχει διάφορα αμινοξέα και βιταμίνες [60]. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για το πλήρες θρεπτικό μέσο.

4.3.10 Τρυψίνη

Η Τρυψίνη χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση των προσκολλημένων κυττάρων που ήταν στην βάση της φλάσκας και διατηρείται στην κατάψυξη.

4.3.11 Ισοπροπανόλη

Η ισοπροπανόλη είναι ένα άχρωμο και εύφλεκτο υγρό που εξατμίζεται γρήγορα και χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση του εργαστηρίου. Η χημική της δομή φαίνεται στο σχήμα 29 [61].



Σχήμα 29: Η χημική δομή της ισοπροπανόλης [62]

4.3.12 MTT

To MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium Bromide) χρησιμοποιείται ως δείκτης στη βιωσιμότητα, το πολλαπλασιασμό και την τοξικότητα των κυττάρων, καθώς μετατρέπεται από ένα κιτρινωπό διάλυμα σε μπλε-μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η χημική δομή του MTT και της φορμαζάνης παρουσιάζονται στο σχήμα 30 [63].



Σχήμα 30: Η χημική δομή των ΜΤΤ και φορμαζάνης [63]

Κεφάλαιο 5°: Πειραματικές μέθοδοι και πρωτόκολλα

5.1 Μεθοδολογίες Φωτοφυσικών μελετών του συμπλόκουΚουρκουμίνης-Γαλλίου

5.1.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις

Αρχικά, είναι απαραίτητη η δημιουργία του μητρικού διαλύματος του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύτη DMSO, από την οποία φτιάχνονται οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις. Οι τελικές συγκεντρώσεις υπολογίζονται από τον τύπο C = $\frac{m*1000}{V*Mr}$, όπου m είναι η μάζα της ουσίας σε gr, V είναι ο όγκος του διαλύματος σε ml, και Mr είναι το μοριακό βάρος της ουσίας.

Μετρήθηκαν 1,4 mgr της ουσίας και αναμίχθηκαν σε 1,5 ml DMSO οπότε το μητρικό διάλυμα του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι C = 1,07 mM. Για το σκοπό της παρούσας εργασίας, πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με συγκεντρώσεις 5x10⁻⁵ M, 2x10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 5x10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M και 5x10⁻⁷ M. Τα διαλύματα αυτά έγιναν με κατάλληλες αραιώσεις του μητρικού διαλύματος σε DMSO και τοποθετήθηκαν 3 ml δείγματος σε κυβέττες όγκου 4,5 ml. Πριν τις μετρήσεις ήταν απαραίτητο να γίνει πρώτα ο μηδενισμός του σήματος του οργάνου, για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται είτε σε θόρυβο του οργάνου, είτε σε πιθανή απορρόφηση του διαλύτη.

Τα φάσματα απορρόφησης πάρθηκαν με το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin - Elmer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1, σε μήκη κύματος που έχουν εύρος 300 nm - 700 nm και ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

5.1.2 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης σε διαλύματα με διάφορους διαλύτες

Για τη φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διάφορους διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες DMSO, PBS και αιθανόλη. Δημιουργήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 10⁻⁵ M για κάθε διαλύτη, με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα με C = 1,07 mM (σε διαλύτη DMSO). Τα τρία αυτά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κυβέττες όγκου 4,5 ml.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για να παρθούν τα φάσματα απορρόφησης είναι το Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin - Elmer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1, σε μήκη κύματος που έχουν εύρος 300 nm - 700 nm και ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

5.1.3 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις

Για τη μελέτη του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου, χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMSO και δημιουργήθηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις 2x10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5x10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M και 5x10⁻⁸ M, οι οποίες προκύπτουν από κατάλληλες αραιώσεις του μητρικού διαλύματος του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου.

Για τις μετρήσεις του φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε το όργανο Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2. Η διέγερση φθορισμού επιλέγεται στο μήκος κύματος όπου το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου έχει την μέγιστη απορρόφηση, δηλαδή τα 480 nm. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται μεταξύ των μηκών κύματος από 500 nm έως 700 nm με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min. Πριν τη λήψη των φασμάτων φθορισμού είναι σημαντικό να πραγματοποιηθεί πρώτα ο μηδενισμός του σήματος, για την αποφυγή σφαλμάτων που μπορεί να οφείλονται στον θόρυβο του οργάνου ή σε πιθανό φθορισμό του διαλύτη DMSO.

5.1.4 Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο απορρόφησης

Για τη μελέτη της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο απορρόφησης, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πρώτα η ακτινοβόληση (η διάταξη ακτινοβόλησης περιγράφεται στην ενότητα 4.2.3) του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και στη συνέχεια να

παρθούν τα φάσματα απορρόφησης. Από το μητρικό διάλυμα κατασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 10⁻⁵ M σε διαλύτη DMSO και τοποθετήθηκε σε κυβέττα με συνολικό όγκο 3ml. Έπειτα, το δείγμα ακτινοβολήθηκε με ισχύ 12,23 mW/cm² για διαφορετικούς χρόνους και πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης.

Είναι αναγκαίο κατά τη διάρκεια του πειράματος να γίνεται χρήση ενός ειδικού μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια του δείγματος και επομένως η ομοιόμορφη ακτινοβόλησή του. Το φάσμα απορρόφησης λαμβάνεται ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0 min - 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 10 min - 30 min. Τα φάσματα απορρόφησης λαμβάνονται στην περιοχή των μηκών κύματος από 300 nm έως 700 nm με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min με το όργανο Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1.

5.1.5 Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης με τη μέθοδο φθορισμού

Για τη μελέτη της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο φθορισμού, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πρώτα ακτινοβόληση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου (η διάταξη ακτινοβόλησης περιγράφεται στην ενότητα 4.2.3). Από το μητρικό διάλυμα κατασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0,5x10⁻⁶ M σε διαλύτη DMSO συνολικού όγκου 3ml. Έπειτα, το δείγμα ακτινοβολήθηκε με ισχύ 12,03 mW/cm².

Κατά την ακτινοβόληση γίνεται χρήση ενός μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε η ακτινοβόληση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το διάλυμα. Η διέγερση φθορισμού επιλέχθηκε στο μήκος κύματος όπου το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου απορροφά μέγιστα. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται ανά λεπτό ακτινοβόλησης για το χρονικό διάστημα 0 min έως 10 min, και ανά 5 λεπτά από 10 min έως 30 min, στη περιοχή μηκών κύματος μεταξύ 500 nm και 700 nm και με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min. Για τη λήψη των φασμάτων της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2.

5.1.6 Φασματοσκοπική μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η μελέτη της ικανότητας παραγωγής των ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου έγινε με τη χρήση της ουσίας NADH. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer, το οποίο περιγράφεται στην ενότητα 4.2.1. Τα φάσματα λαμβάνονται στο εύρος μηκών κύματος 300 nm - 700 nm και ο έλεγχος της απορρόφησης γίνεται στα 340 nm, καθώς εκεί δημιουργείται η χαρακτηριστική κορυφή του NADH. Η ταχύτητα σάρωσης είναι στα 480 nm/min, ενώ η ισχύς ακτινοβόλησης είναι 12,50 mW/cm².

Το διάλυμα συνολικού όγκου 3 ml αποτελείται από:

- 73,5 μΙ διαλύματος NADH, το οποίο πάρθηκε από το μητρικό διάλυμα του
 NADH με συγκέντρωση C = 4.37 mM και διαλύτη PBS
- 300 μΙ διαλύματος συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης C = 10^{-5} M
- 2626,5 μl DMSO

Τα φάσματα απορρόφησης λαμβάνονται ανά λεπτό ακτινοβόλησης (η διάταξη ακτινοβόλησης περιγράφεται στην ενότητα 4.2.3) στο χρονικό διάστημα από 0 min έως 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 10 min έως 30 min. Όμοια με τα προηγούμενα πειράματα, κατά την ακτινοβόληση γίνεται χρήση ενός μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε η ακτινοβόληση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το διάλυμα.

5.2 Μεθοδολογίες κυτταρικών καλλιεργειών

5.2.1 Απόψυξη κυτταρικής σειράς MCF-7

Τα κύτταρα αποθηκεύονται και διατηρούνται σε δοχείο υγρού αζώτου. Για την απόψυξη της κυτταρικής σειράς MCF-7 είναι απαραίτητα τα διαλύματα ξεπλύματος των κυττάρων μετά το ξεπάγωμα και του πλήρους θρεπτικού μέσου. Το διάλυμα ξεπλύματος έχει τελικό όγκο 10 ml και αποτελείται από 9 ml PBS, 1ml FBS και 80 μl αντιβιοτικό και είναι απαραίτητο για την αναστολή της δράσης του DMSO το οποίο είναι βασικό συστατικό για τη κατάψυξη των κυττάρων. Το διάλυμα του πλήρους θρεπτικού μέσου έχει τελικό όγκο 15 ml και αποτελείται από 13,5 ml DMEM, 1,5 ml FBS και 120 μl αντιβιοτικό.

Αρχικά αφαιρείται το φιαλίδιο με τα κύτταρα από το υγρό άζωτο και τοποθετείται σε ένα δοχείο ζέσεως με απιονισμένο νερό μέσα στο κλίβανο για να έρθουν τα κύτταρα στη θερμοκρασία του κλιβάνου και να ξεπαγώσουν. Έπειτα τα κύτταρα τοποθετούνται σε tube με τα 9 ml του διαλύματος του ξεπλύματος, ενώ με το υπόλοιπο 1 ml πραγματοποιούνται 2 ξεπλύματα στο φιαλίδιο με τα κύτταρα και προστίθεται στο υπόλοιπο διάλυμα. Στο tube είναι πλέον τα κύτταρα με 10 ml διαλύματος ξεπλύματος και τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 7 λεπτά στις 1200 rpm για να απομονωθούν τα κύτταρα από το υπερκείμενο.

Αφού ολοκληρωθεί η φυγόκεντρος και αφαιρεθεί το υπερκείμενο για μείνουν μόνο τα κύτταρα στο tube, εισάγονται 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και πραγματοποιείται καλό pipetting για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα. Τέλος, τα κύτταρα με το πλήρες θρεπτικό μέσο εισάγονται πολύ προσεκτικά στη φλάσκα, στην οποία έχουν ήδη εισαχθεί 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και η φλάσκα τοποθετείται στο κλίβανο για επώαση.

5.2.2 Ανακαλλιέργεια κυτταρικής σειράς MCF-7

Αφού πραγματοποιηθεί η διαδικασία της απόψυξης των κυττάρων και παραμείνει η φλάσκα με τα κύτταρα στο κλίβανο για λίγες μέρες, πρέπει να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Αν ο πολλαπλασιασμός τους είναι ικανοποιητικός, γίνεται η ανακαλλιέργειά τους. Τα απαραίτητα διαλύματα για την ανακαλλιέργεια είναι τα εξής:

- Διάλυμα για την αναστολή της δράσης της τρυψίνης με όγκο 10 ml που αποτελείται από 9 ml PBS, 1 ml FBS και 80 μl αντιβιοτικό.
- Διάλυμα πλήρους θρεπτικού μέσου με όγκο 15 ml που αποτελείται από 13,5 ml DMEM, 1,5 ml FBS και 120 μl αντιβιοτικό.
Διάλυμα για ξέπλυμα με όγκο 10 ml που αποτελείται από 10 ml PBS και 80 μl αντιβιοτικό.

Αρχικά απορρίπτεται με προσοχή το παλιό θρεπτικό μέσο και ξεπλένεται η φλάσκα με 2 ml από το διάλυμα ξεπλύματος. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά 2 φορές. Έπειτα, προστίθενται 2 ml τρυψίνης με στόχο να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τη φλάσκα για το πολύ έως 3 λεπτά, καθώς είναι τοξική για τα κύτταρα. Στη συνέχεια προστίθενται στη φλάσκα 6 ml του διαλύματος αναστολής της δράσης της τρυψίνης και όλο το περιεχόμενο της φλάσκας εισάγεται σε ένα tube. Έπειτα εισάγεται στη φλάσκα το υπόλοιπο του διαλύματος της αναστολής της δράσης της τρυψίνης (4 ml) και μετά την ανακίνησή της, εισάγεται το διάλυμα στο ίδιο tube. Το tube αυτό μπαίνει στο μηχάνημα της φυγόκεντρου για 7 λεπτά στις 1200 στροφές. Εν συνεχεία αφαιρείται το υπερκείμενο από το tube και εισάγονται 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Χρειάζεται να γίνει πολύ καλό pipetting για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα και να μπορέσουν να τοποθετηθούν σε μια καινούρια φλάσκα στην οποία έχουν ήδη εισαχθεί 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Τέλος, παρατηρείται η φλάσκα στο μικροσκόπιο και τοποθετείται στο κλίβανο για να γίνει η επώαση των κυττάρων.

5.2.3 Κατάψυξη κυτταρικής σειράς MCF-7

Για να πραγματοποιηθεί η κατάψυξη των κυττάρων, είναι απαραίτητο το αντίστοιχο διάλυμα με συνολικό όγκο 1 ml το οποίο αποτελείται από 800 μl DMEM, 200 μl FBS και 8 μl αντιβιοτικού. Σε αυτό το διάλυμα προστίθενται τα κύτταρα, καθώς και 70 μl DMSO σε κατάλληλο φιαλίδιο για κατάψυξη. Το DMSO είναι απαραίτητο συστατικό για τη κατάψυξη των κυττάρων καθώς χάρη σε αυτό αποτρέπεται ο σχηματισμός κρυστάλλων νερού στο εσωτερικό τους.

Αρχικά το φιαλίδιο με τα κύτταρα τοποθετείται στον υπερκαταψύκτη στους -80°C για 24 ώρες και έπειτα στο δοχείο υγρού αζώτου στους -196 °C. Εκεί, τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν για αρκετό χρονικό διάστημα.

5.3 Έλεγχος τοξικότητας των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7

Ο έλεγχος της τοξικότητας των κυττάρων απουσία φωτός είναι απαραίτητος, καθώς πρέπει να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή που θα χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία, η οποία δε θα είναι από μόνη της τοξική για τα κύτταρα. Για αυτό το σκοπό γίνεται χρήση του πρωτοκόλλου βιωσιμότητας της μεθόδου MTT.

Αρχικά προετοιμάζεται το plate με διαστάσεις 8 x 12 πηγαδάκια, στο οποίο το κάθε πηγαδάκι έχει 20.000 κύτταρα με 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και τοποθετείται στο κλίβανο για 24 ώρες. Αφού περάσουν οι 24 ώρες, αφαιρείται το υπερκείμενο από τα πηγαδάκια με προσοχή. Έπειτα, φτιάχνονται οι συγκεντρώσεις 1 μM, 3 μM και 5 μM του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι σε πλήρες θρεπτικό μέσο συνολικού όγκου 0.5 ml.

Οι συγκεντρώσεις αυτές εισάγονται στα πηγαδάκια σε 4 επαναλήψεις από 100 μl η κάθε συγκέντρωση, δηλαδή 4 πηγαδάκια θα έχουν συγκέντρωση 1 μM του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου, 4 πηγαδάκια θα έχουν συγκέντρωση 3 μM και 4 πηγαδάκια θα έχουν συγκέντρωση 5 μM. Ομοίως και για την Κουρκουμίνη Ι. Σε 6 επαναλήψεις εισάγεται μόνο το πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς κάποια ουσία, και τα πηγαδάκια αυτά θα χρησιμοποιηθούν ως αναφορά. Αφού εισαχθούν οι ουσίες, το plate τοποθετείται στο κλίβανο για 3 ώρες. Αφού περάσουν οι 3 ώρες αφαιρείται το υπερκείμενο από όλα τα πηγαδάκια και εισάγεται φρέσκο πλήρες θρεπτικό μέσο των 100 μl.

Τέλος, το plate τοποθετείται στο κλίβανο για 24 ώρες για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο ελέγχου ΜΤΤ που παρουσιάζεται στη συνέχεια.

5.3.1 Πρωτόκολλο ελέγχου της βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς MCF-7 (MTT)

Μία μέρα πριν γίνει χρήση του πρωτοκόλλου πρέπει να ετοιμαστεί το διάλυμα ΜΤΤ (για το οποίο γίνεται αναλυτική αναφορά στο κεφάλαιο 4.3.13) ως εξής:

To MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 3-(4,5-Dimethyl-2-thizolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων και διαλύεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο σε αναλογία 1 mg/ml. Μετά τη διάλυση, αποκτά ένα κιτρινωπό χρώμα και τοποθετείται στο ψυγείο. Το διάλυμα αυτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 24 ωρών. Όταν αντιδρά με τα ζωντανά κύτταρα, παράγονται μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης. Έπειτα, οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται σε DMSO και μετράται η απορρόφησή τους. Η ποσότητα των κρυστάλλων φορμαζάνης που προκύπτει είναι ανάλογη του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, καθώς τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να σχηματίσουν κρυστάλλους.

Αρχικά, αφαιρείται το παλιό θρεπτικό μέσο από τα πηγαδάκια και εισάγονται 100 μl του διαλύματος MTT στο κάθε ένα και το plate αφήνεται για 4 ώρες στο κλίβανο. Μετά τις 4 ώρες επώασης, αφαιρείται το υπερκείμενο από κάθε πηγαδάκι και εισάγονται 100 μl DMSO. Τέλος, λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης του plate από τα 380 nm έως τα 700 nm και καταγράφεται η απορρόφηση στα 565 nm και τα 690 nm, καθώς υπολογίζεται η τιμή της διαφοράς τους. Η απορρόφηση στα 565 nm αναφέρεται στο μέγιστο της απορρόφησης των κρυστάλλων φορμαζάνης, ενώ στα 690 nm αναφέρεται στον θόρυβο που προκύπτει. Μέσω της απορρόφησης διαπιστώνεται με ακρίβεια η βιωσιμότητα των κυττάρων.

5.4 Χωρικός εντοπισμός των φωτοευαισθητοποιητών στη κυτταρική σειρά MCF-7

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού είναι απαραίτητη πριν εφαρμοστεί η φωτοδυναμική θεραπεία για να διαπιστωθεί η θέση της συγκέντρωσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι μέσα στο κύτταρο.

Μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή στον ασθενή, μπορεί να συσσωρευτεί σε μιτοχόνδρια, σε λυσοσώματα, στη μεμβράνη πλάσματος ή στον πυρήνα του κυττάρου. Ωστόσο, επιθυμητή θέση συγκέντρωσης είναι τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο σε αντίθεση με τον πυρήνα, καθώς στον πυρήνα μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις του DNA μιας και εκεί είναι αποθηκευμένο το γενετικό υλικό του ανθρώπου. Τα μιτοχόνδρια είναι επιθυμητή θέση συγκέντρωσης των

φωτοευαισθητοποιητών γιατί παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια στα κύτταρα και ρυθμίζουν την απόπτωσή τους [4], [64].

Αρχικά προετοιμάζονται 3 τριβλία με 100.000 κύτταρα το κάθε ένα καθώς και με πλήρες θρεπτικό μέσο. Σε κάθε τριβλίο τοποθετείται μία καλυπτρίδα, ώστε να επικολληθούν σε αυτή τα κύτταρα και να γίνει στη συνέχεια η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Τα 3 αυτά τριβλία τοποθετούνται στη συνέχεια στο κλίβανο και αφήνονται να επωαστούν για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες, εισάγεται στο ένα τριβλίο το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης 5 μM, στο άλλο τριβλίο εισάγεται Κουρμουμίνη Ι της ίδιας συγκέντρωσης και στο τελευταίο δεν εισάγεται καμία ουσία, καθώς θα χρησιμοποιηθεί σαν αναφορά. Τα τριβλία αυτά τοποθετούνται στο κλίβανο για να επωαστούν για 3 ώρες.

Αφού περάσουν οι 3 ώρες, το κάθε τριβλίο πλένεται δύο φορές με 1 ml PBS ώστε να απομακρυνθεί η ουσία που δεν έχει εισέλθει στα κύτταρα. Έπειτα, αφαιρείται η καλυπτρίδα πάνω στην οποία έχουν κολλήσει τα κύτταρα και τοποθετείται σε κατάλληλο πλακίδιο μικροσκοπίου ώστε να γίνει η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP8 MP.

5.5 Μεθοδολογία εφαρμογής φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά MCF-7

Σκοπός των πειραμάτων της ενότητας αυτής είναι η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητές το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και την Κουρκουμίνη Ι. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 5 μΜ και για τις δύο ουσίες. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε γιατί στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο της τοξικότητας των ουσιών στα κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι η βιωσιμότητά τους παρέμεινε στο 100 %. Η ακτινοβόληση έγινε με ισχύ 6 mW/cm², ενώ η χρονική διάρκεια της ακτινοβόλησης ήταν 167 sec, 334 sec και 501 sec, οπότε η συνολική δόση ενέργειας είναι τελικά 1 J/cm², 2 J/cm² και 3 J/cm² αντίστοιχα.

Αρχικά προετοιμάζεται το plate με κάθε πηγαδάκι να περιέχει 20.000 κύτταρα το καθένα και 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και αφήνεται στο κλίβανο για 24 ώρες για να μπορέσουν τα κύτταρα να κολλήσουν στο plate. Μετά το πέρας των 24 ωρών,

γίνεται η αφαίρεση του υπερκειμένου από τα πηγαδάκια με προσοχή και προστίθενται 100 μl διαλύματος Κουρκουμίνης συγκέντρωσης 5 μM σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Οι συγκεντρώσεις αυτές εισάγονται στα πηγαδάκια σε 6 επαναλήψεις των 100 μl. Έπειτα το plate αφήνεται στο κλίβανο για 3 ώρες. Μετά τις 3 ώρες γίνεται η αφαίρεση του υπερκειμένου και πραγματοποιείται η ακτινοβόληση.

Κάθε πειραματική συνθήκη πραγματοποιείται 6 φορές, δηλαδή 6 πηγαδάκια με συγκέντρωση 5 μΜ του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ακτινοβολούνται για 167 sec, 6 πηγαδάκια με συγκέντρωση 5 μΜ του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ακτινοβολούνται για 334 sec και 6 πηγαδάκια με συγκέντρωση 5 μΜ του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ακτινοβολούνται για 501 sec. Ομοίως και για την Κουρκουμίνη Ι. Σε 12 επαναλήψεις εισάγεται μόνο το πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς κάποια ουσία για να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά. Ακόμη, υπάρχουν και 24 πηγαδάκια που δεν ακτινοβολούνται καθόλου. Μετά την ακτινοβόληση εισάγονται στα πηγαδάκια από 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και τοποθετούνται στο κλίβανο για 24 ώρες για να γίνει ο έλεγχος βιωσιμότητας MTT, για τον οποίο έχει γίνει περιγραφή στην ενότητα 5.3.1. Κεφάλαιο 6°: Αποτελέσματα και συμπεράσματα

6.1 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 5.1.1, από το μητρικό διάλυμα του υπό εξέταση φωτοευαισθητοποιητή σε DMSO με κατάλληλες αραιώσεις φτιάχνονται τα διαλύματα με τις εξής συγκεντρώσεις: 5x10⁻⁵ M, 2x10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 5x10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M και 5x10⁻⁷ M, για τις οποίες και πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer (ενότητα 4.2.1), σε μήκη κύματος που έχουν εύρος 300 nm - 700 nm και ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

6.1.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων (σχήμα 31) που έχουν ήδη αναφερθεί. Ακόμη, παρατίθεται και το διάγραμμα της μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης ως προς τη συγκέντρωση της ουσίας (σχήμα 32).



Σχήμα 31: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διάφορες συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση στα 480 nm	Μήκος κύματος μέγιστης
		απορρόφησης (nm)
5 x 10 ⁻⁵	2,466	488
2 x 10 ⁻⁵	1,069	482
10 ⁻⁵	0,517	474
5 x 10 ⁻⁶	0,234	463
10 ⁻⁶	0,033	439
5 x 10 ⁻⁷	0,005	438

Πίνακας 2: Συγκριτικός πίνακας συγκέντρωσης, απορρόφησης στα 480 nm και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου



Σχήμα 32: Διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως προς τη συγκέντρωση

6.1.2 Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα συγκριτικά φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι με συγκέντρωση C = 2 x 10⁻⁵ M συναρτήσει του μήκους κύματος (σχήμα 33), καθώς και το συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης των δύο ουσιών ως προς τη συγκέντρωση (σχήμα 34).



Σχήμα 33: Συγκριτικό φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι με συγκέντρωση 2x10⁻⁵M

Ουσία	Συγκέντρωση (Μ)	Μέγιστη απορρόφηση	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm)
Σύμπλοκο Κουρκουμίνης- Γαλλίου	2 x 10 ⁻⁵	1,069	482
Κουρκουμίνη Ι	2 x 10 ⁻⁵	0,838	435

Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας συγκέντρωσης, μέγιστης απορρόφησης και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι



Σχήμα 34: Συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της μέγιστης απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι ως προς τη συγκέντρωσή τους

6.1.3 Συμπεράσματα

Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι η μέγιστη απορρόφηση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου μεταβάλλεται ως προς τη συγκέντρωση σύμφωνα με τη σχέση:

y = 0,0023 + 49861x με R² = 0,99841, ενώ για την Κουρκουμίνη Ι:

y = -0,0064 + 42194x $\mu\epsilon$ R² = 0,9993.

Δηλαδή, η μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των δύο ουσιών σε σχέση με τη συγκέντρωση είναι γραμμική και συμφωνεί με τον νόμο Beer Lambert που έχει τύπο: A = log(I₀/I) = ε x b x c. Όπου A είναι η απορρόφηση, I₀ είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I είναι η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, ε είναι η μοριακή απορροφητικότητα, b το πάχος της κυβέττας και c η συγκέντρωση της ουσίας.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου παρουσιάζει μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή της. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε πιθανά συσσωματώματα

που δημιουργούνται μέσα στο διάλυμα λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης. Ωστόσο η ένταση της απορρόφησης αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης (σχήμα 31, σχήμα 32).

Στο συγκριτικό διάγραμμα (σχήμα 33), το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου φαίνεται να εμφανίζει πιο υψηλή απορρόφηση συγκριτικά με την Κουρκουμίνη Ι για συγκέντρωση 2 x 10⁻⁵ M.

Το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση είναι για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου τα 482 nm ενώ για την Κουρκουμίνη Ι τα 435 nm (πίνακας 3) για συγκέντρωση 2 x 10⁻⁵ M. Παρατηρείται επομένως μία μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift) εξαιτίας της προσθήκης του Γαλλίου κάτι το οποίο ήταν και ο αρχικός σκοπός του σχεδιασμού και της σύνθεσης του νέου φωτοευαισθητοποιητή. Όπως όμως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος διέγερσης του φωτοευαισθητοποιητή (στη συγκεκριμένη περίπτωση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου), τόσο μεγαλύτερο είναι το βάθος διείσδυσής του κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία.

6.2 Φασματοσκοπική μελέτη απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορους διαλύτες

Σε αυτή την ενότητα πραγματοποιείται φασματοσκοπική μελέτη του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορους διαλύτες, όπως έγινε η περιγραφή στην ενότητα 5.1.2. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό είναι οι DMSO, PBS και αιθανόλη. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για συγκέντρωση 10⁻⁵ M, που δημιουργήθηκε με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα σε DMSO.

Τα φάσματα απορρόφησης πάρθηκαν με το φασματοφωτόμετρο απορρόφησης Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer (ενότητα 4.2.1), σε μήκη κύματος που έχουν εύρος 300 nm - 700 nm και ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

6.2.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορους διαλύτες, όπως έχει ήδη αναφερθεί (σχήμα 35).



Σχήμα 35: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ σε διάφορους διαλύτες

Συγκέντρωση	Μέγιστη απορρόφηση		Μήκος κύ	ματος μέγιστης	απορρόφησης	
(M)				(nm)		
	DMSO	PBS	Αιθανόλη	DMSO	PBS	Αιθανόλη
10 ⁻⁵	0,52	0,25	0,53	474	439	462

Πίνακας 4: Πίνακας συγκέντρωσης, μέγιστης απορρόφησης και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου

6.2.2 Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στα παρακάτω σχήματα (σχήμα 36, σχήμα 37, σχήμα 38) παρουσιάζονται τα συγκριτικά φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την

Κουρκουμίνη Ι με συγκέντρωση C = 10^{-5} M συναρτήσει του μήκους κύματος, για τους διάφορους διαλύτες.



Σχήμα 36: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻ ⁵ Μ σε διαλύτη DMSO



Σχήμα 37: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻ ⁵ Μ σε διαλύτη αιθανόλη



Σχήμα 38: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻ ⁵ Μ σε διαλύτη PBS

Ουσία	Μέγιστη απορρόφηση		Mŕ	κος κύματος μ	έγιστης	
				απορροφησης	(nm)	
	DMSO	PBS	Αιθανόλη	DMSO	PBS	Αιθανόλη
Σύμπλοκο	0,52	0,25	0,53	474	439	462
Κουρκουμίνης-						
Γαλλίου						
Κουρκουμίνη Ι	0,58	0,18	0,62	435	429	426

Πίνακας 5: Πίνακας απορρόφησης και μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ

6.2.3 Συμπεράσματα

Για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου όταν χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMSO και αιθανόλη, τα φάσματα απορρόφησης εμφανίζουν την ίδια ένταση απορρόφησης αλλά είναι ελαφρώς μετατοπισμένα. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή απορρόφησης για το διάλυμα με διαλύτη DMSO βρίσκεται σε μήκος κύματος 474 nm με τιμή απορρόφησης τα 0,52 (πίνακας 4), ενώ για το διάλυμα σε αιθανόλη είναι σε μήκος κύματος 462 nm και με τιμή 0,53. Η χρήση της αιθανόλης ως διαλύτη προκάλεσε μία μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift). Παρατηρείται δηλαδή μία μικρή απόκλιση.

Όσον αφορά τα διαλύματα του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε PBS, το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζει μία μετατόπιση στα αριστερά συγκριτικά με τους άλλους διαλύτες, με το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης να είναι στα 439 nm. Ακόμη, η τιμή της μέγιστης απορρόφησης είναι αρκετά χαμηλότερη απ' ότι στα άλλα δύο διαλύματα. Αυτό προκύπτει διότι το PBS είναι ένας υδατικός διαλύτης, οπότε τα μόρια της Κουρκουμίνης έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα σε αυτούς τους διαλύτες γιατί η Κουρκουμίνη είναι μία υδρόφοβη ένωση.

Συγκριτικά το σύμπλοκο της Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι, δείχνουν να παρουσιάζουν μια κοινή συμπεριφορά όταν χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMSO και αιθανόλη, όπως φαίνεται στα σχήματα 36 και 37. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι διαλύτες αυτοί είναι οργανικοί, οπότε διατηρείται η χαρακτηριστική μορφή των φασμάτων αυτών. Για την Κουρκουμίνη Ι όταν χρησιμοποιείται ο διαλύτης DMSO, η μέγιστη απορρόφηση παρατηρείται στα 435 nm με τιμή 0,58 (πίνακας 5). Όταν χρησιμοποιείται ο διαλύτης αιθανόλη, η μέγιστη τιμή απορρόφησης είναι στα 426 nm με τιμή 0,62. Δηλαδή, η μέγιστη απορρόφηση έχει παραπλήσια τιμή για τις δύο ουσίες, με την διαφορά ότι η Κουρκουμίνη Ι παρουσιάζει την μέγιστη αυτή τιμή σε χαμηλότερα μήκη κύματος, από ότι το σύμπλοκο της Κουρκουμίνης-Γαλλίου.

Όσον αφορά το διάλυμα της Κουρκουμίνης Ι σε διαλύτη PBS παρατηρείται από το σχήμα 38 ότι το φάσμα απορρόφησης παρουσιάζει μία διαφορετική μορφή. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή της μέγιστης απορρόφησης είναι στα 429 nm με τιμή 0,18, ενώ παρατηρείται και μία δεύτερη κορυφή στα 358 nm. Παρατηρείται συνεπώς μειωμένη ένταση απορρόφησης αλλά και το «σπάσιμο» της κορυφής σε δύο κορυφές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη παρουσίας συσσωματωμάτων. Το PBS είναι ένα υδατικό μέσο, οπότε τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν λόγω της τάσης των μορίων της Κουρκουμίνης να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικούς διαλύτες, καθώς είναι υδρόφοβη.

Συμπερασματικά, το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου μεταβάλλει το φάσμα απορρόφησής της ανάλογα με το διαλύτη. Στην αιθανόλη παρουσιάζει μία ελαφριά μετατόπιση σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης σε DMSO. Σε υδατικό διάλυμα η μετατόπιση στα μπλε γίνεται μεγαλύτερη και η ένταση της απορρόφησης μειώνεται περίπου στο μισό ωστόσο διατηρεί το χαρακτηριστικό φάσμα της. Και στους τρεις διαλύτες (DMSO, αιθανόλη και PBS) το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου διατηρεί τη μετατόπιση της σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την Κουρκουμίνη Ι.

6.3 Φασματοσκοπική μελέτη φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις

Για τη μελέτη του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου (ενότητα 5.1.3), χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMSO και δημιουργήθηκαν τα διαλύματα με συγκεντρώσεις 2x10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5x10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M και 5x10⁻⁸ M. Οι συγκεντρώσεις αυτές προκύπτουν από κατάλληλες αραιώσεις του μητρικού διαλύματος του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε DMSO. Για τις μετρήσεις του φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Perkin -Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα 4.2.2). Η διέγερση φθορισμού επιλέγεται στα 480 nm, εκεί όπου το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου έχει την μέγιστη απορρόφηση. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται μεταξύ των μηκών κύματος από 500 nm έως 700 nm με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min.

6.3.1 Αποτελέσματα

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διαλύματα με διάφορες συγκεντρώσεις (σχήμα 39), καθώς και το διάγραμμα της μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση (σχήμα 40).



Σχήμα 39: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου σε διάφορες συγκεντρώσεις

Συγκέντρωση (M)	Φθορισμός (AU) στα 531
	nm
2 x 10 ⁻⁶	570,65
10 ⁻⁶	341,19

5 x 10 ⁻⁷	101,63
10 ⁻⁷	21,34
5 x 10 ⁻⁸	10,39

Πίνακας 6: Πίνακας συγκέντρωσης και μέγιστης τιμής φθορισμού στα 531 nm του συμπλόκου Κουρκουμίνης-

Γαλλίου



Σχήμα 40: Διάγραμμα μεταβολής του μέγιστου φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως προς τη συγκέντρωση

6.3.2 Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα συγκριτικά φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνη Ι με συγκέντρωση C = 5x10⁻⁷ Μ συναρτήσει του μήκους κύματος (σχήμα 41), καθώς και το συγκριτικό διάγραμμα της μεταβολής του μέγιστου φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση (σχήμα 42).



Σχήμα 41: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι με συγκέντρωση 5x10⁻⁷ Μ

Ουσία	Φθορισμός (AU) στα 531	Μήκος κύματος
	nm	διέγερσης (nm)
Σύμπλοκο	101,63	480
Κουρκουμίνης-Γαλλίου		
Κουρκουμίνη Ι	306,36	435

Πίνακας 7: Πίνακας μέγιστης τιμής φθορισμού στα 531 nm και μήκους κύματος διέγερσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι



Σχήμα 42: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι ως προς τη συγκέντρωση

6.3.3 Συμπεράσματα

Το μήκος κύματος της διέγερσης στα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου για τα διαλύματα με τις διάφορες συγκεντρώσεις επιλέγεται να είναι εκεί που παρουσιάζεται η μέγιστη απορρόφηση, δηλαδή τα 480 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος διέγερσης παρατηρείται ο μέγιστος εκπεμπόμενος φθορισμός, ενώ η τιμή του μέγιστου φθορισμού παρουσιάζεται στα 531 nm. Όπως φαίνεται κι από τον πίνακα 6, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της ουσίας τόσο μεγαλύτερη τιμή έχει ο φθορισμός.

Η καμπύλη μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι: y = 2,975*10⁸ x - 8,15 με R² = 0,98088, όπου y είναι ο φθορισμός και x η συγκέντρωση. Από αυτή τη σχέση προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τιμή του φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων της ουσίας για το συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν. Η σύγκριση των φασμάτων φθορισμού για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι, έγινε για την συγκέντρωση $5x10^{-7}$ M σε διαλύτη DMSO. Το μήκος κύματος διέγερσης για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι τα 480 nm, ενώ για την Κουρκουμίνη Ι τα 435 nm, καθώς σε αυτά τα μήκη κύματος παρουσιάζεται η μέγιστη τιμή της απορρόφησης για κάθε ουσία αντίστοιχα. Και για τις δύο ουσίες η μέγιστη τιμή του φθορισμού παρουσιάζεται στα 531 nm και η τιμή της για το σύμπλοκο Κουρκουμίνη-Γαλλίου είναι 101,63 (AU) (πίνακας 6), ενώ για την Κουρκουμίνη Ι 306,36 (AU) (πίνακας 7). Η καμπύλη μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού ως προς τη συγκέντρωση της Κουρκουμίνης Ι είναι: y = 6,144*10⁸ x - 0,93 με R² = 0,99988, όπου y είναι ο φθορισμός και x η συγκέντρωση. Από αυτή τη σχέση προκύπτει κι εδώ το συμπέρασμα ότι η τιμή του φθορισμού μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση των διαλυμάτων της ουσίας.

Τέλος, από τα φάσματα φθορισμού παρατηρείται ότι διατηρείται η μορφή του κάθε φάσματος και για τις δύο ουσίες. Η προσθήκη του Γαλλίου στην Κουρκουμίνη Ι, δεν άλλαξε το σχήμα και τη θέση του φάσματος φθορισμού. Ωστόσο μείωσε σημαντικά την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (σχήμα 41 και 42).

6.4 Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με τη μέθοδο απορρόφησης

Για τη μελέτη της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο απορρόφησης, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πρώτα η ακτινοβόληση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου (η διάταξη ακτινοβόλησης παρουσιάζεται στην ενότητα 4.2.3) και στη συνέχεια να παρθούν τα φάσματα απορρόφησης. Όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 5.1.4 κατασκευάστηκε το διάλυμα συγκέντρωσης 10⁻⁵ M σε διαλύτη DMSO και ακτινοβολήθηκε με ισχύ 12,23 mW/cm². Τα φάσματα απορρόφησης λήφθηκαν ανά λεπτό ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 0 min - 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 10 min - 30 min.

Είναι αναγκαίο κατά τη διάρκεια του πειράματος να γίνεται χρήση ενός ειδικού μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιόμορφη ακτινοβόληση στο

διάλυμα. Τα φάσματα απορρόφησης λαμβάνονται στην περιοχή των μηκών κύματος από 300 nm έως 700 nm με το όργανο Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer (ενότητα 4.2.1).

6.4.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με συγκέντρωση 10⁻⁵ Μ για τους διάφορους χρόνους ακτινοβόλησης (σχήμα 43). Επιπλέον παρατίθεται και ένα συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής της απορρόφησης με και χωρίς ακτινοβόληση (σχήμα 44).



Σχήμα 43: Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min – 30 min

Χρόνος	Τιμή απορρόφησης στα
ακτινοβόλησης	460 nm
0	0,533
1	0,542
2	0,541
3	0,540

4	0,537
5	0,533
6	0,530
7	0,526
8	0,523
9	0,518
10	0,520
15	0,501
20	0,476
25	0,457
30	0,438

Πίνακας 8: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και έντασης της απορρόφησης στα 460 nm του συμπλόκου

Κουρκουμίνης-Γαλλίου



Σχήμα 44: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της έντασης της απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με ακτινοβόληση και χωρίς ακτινοβόληση

6.4.2 Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το συγκριτικό διάγραμμα της μέγιστης τιμής της απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι με συγκέντρωση C = 10^{-5} M, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης (σχήμα 45).



Σχήμα 45: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της έντασης της απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με την Κουρκουμίνη Ι συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης

6.4.3 Συμπεράσματα

Πριν την ακτινοβόληση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου (t=0 min), το φάσμα απορρόφησης, παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 476 nm. Από την έναρξη της ακτινοβόλησης και μετά, παρατηρείται μία μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος και πιο συγκεκριμένα η μέγιστη απορρόφηση παρατηρείται στα 460 nm.

Η καμπύλη μεταβολής για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου περιγράφεται από την εξίσωση: y = 102,97 – 0,66x με R² = 0,97246, όπου y είναι η τιμή της απορρόφησης μετά την ακτινοβόληση και x ο χρόνος της ακτινοβόλησης. Η απορρόφηση της ουσίας

ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης παρουσιάζει γραμμική πτώση και μετά το πέρας των 30 λεπτών φτάνει στο 82 % της αρχικής της τιμής (πίνακας 8). Πιο συγκεκριμένα, έως τα 10 πρώτα λεπτά της ακτινοβόλησης, η απορρόφηση της ουσίας παραμένει σχεδόν σταθερή και επομένως η ουσία μπορεί να διατηρήσει τη δράση της, ενώ από τα 10 λεπτά ακτινοβόλησης η ένταση της απορρόφησης αρχίζει να μειώνεται εντονότερα. Ωστόσο, ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης είναι αργός επομένως η ουσία παρουσιάζει φωτοσταθερότητα.

Η καμπύλη μεταβολής για την Κουρκουμίνη Ι περιγράφεται από την εξίσωση y = 70,40 * $e^{-x/30,47}$ + 26,57 με R² = 0,99145, όπου y είναι η τιμή της απορρόφησης μετά την ακτινοβόληση και x ο χρόνος της ακτινοβόλησης. Η απορρόφηση της ουσίας ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης παρουσιάζει εκθετική πτώση και μετά το πέρας των 30 λεπτών φτάνει στο 52 % της αρχικής της τιμής. Η ουσία αυτή παρουσιάζει μεγαλύτερη φωτολεύκανση από ότι το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, δηλαδή φωτοκαταστρέφεται πιο γρήγορα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της σταθερότητας της απορρόφησης με το χρόνο, απουσία ακτινοβόλησης, για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, με σταθερές τις συνθήκες του πειράματος. Όπως παρατηρείται στο συγκριτικό σχήμα 44, η τιμή της μέγιστης απορρόφησης στα 464 nm για όλους τους χρόνους, παραμένει σχεδόν σταθερή. Επομένως το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει σταθερότητα ως προς την απορρόφηση απουσία ακτινοβόλησης.

6.5 Φασματοσκοπική μελέτη φωτολεύκανσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με τη μέθοδο φθορισμού

Για τη μελέτη της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο φθορισμού, είναι απαραίτητο πρώτα να ακτινοβοληθεί το δείγμα και έπειτα να παρθεί το φάσμα του φθορισμού, όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 5.1.5. Από το μητρικό διάλυμα κατασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0,5x10⁻⁶ M σε διαλύτη DMSO και η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με ισχύ 12,03 mW/cm².

81

Κατά την ακτινοβόληση (ενότητα 4.2.3) είναι απαραίτητη η χρήση ενός μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε η ακτινοβόληση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το διάλυμα. Η διέγερση φθορισμού επιλέχθηκε στα 480 nm, εκεί το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου απορροφά μέγιστα. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται ανά λεπτό ακτινοβόλησης για το χρονικό διάστημα 0 min έως 10 min, και ανά 5 λεπτά από 10 min έως 30 min, στη περιοχή μηκών κύματος μεταξύ 500 nm και 700 nm με το φασματοφωτόμετρο φθορισμού Perkin - Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer (ενότητα 4.2.2).

6.5.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με συγκέντρωση 0,5x10⁻⁶ M (σχήμα 46) για τους διαφορετικούς χρόνους ακτινοβόλησης, καθώς και το συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου με και χωρίς ακτινοβόληση (σχήμα 47).



Σχήμα 46: Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης 0,5x10⁻⁶ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min – 30 min

Χρόνος	Μέγιστη τιμή
ακτινοβόλησης	φθορισμού (AU) στα
	531 nm
0	147,21
1	132,59
2	118,11
3	113,46
4	107,25
5	103
6	96,6
7	96,32
8	97,45
9	90,21
10	88,45
15	79,14
20	72,27
25	67,82
30	67,23

Πίνακας 9: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και μέγιστης τιμής φθορισμού στα 531 nm του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου



Σχήμα 47: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου στα 531 nm, με ακτινοβόληση και χωρίς ακτινοβόληση

6.5.2 Σύγκριση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται το συγκριτικό διάγραμμα της μέγιστης τιμής του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι στα 531 nm με συγκέντρωση C = 0,5x10⁻⁶ M, συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης (σχήμα 48).



Σχήμα 48: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της μέγιστης τιμής του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι ,συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης

6.5.3 Συμπεράσματα

Το μήκος κύματος της διέγερσης στα φάσματα φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι τα 480 nm, ενώ για την Κουρκουμίνη Ι είναι τα 435 nm. Η τιμή του μέγιστου φθορισμού και για τις δύο ουσίες παρουσιάζεται στα 531 nm. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε είναι 0,5x10⁻⁶ M σε διαλύτη DMSO.

Η καμπύλη μεταβολής της μέγιστης έντασης φθορισμού για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου περιγράφεται από την εξίσωση: y = 50,16 * $e^{-x/7.01}$ + 46,22 με R² = 0,97778, όπου γ είναι η τιμή του μέγιστου φθορισμού μετά την ακτινοβόληση και x ο χρόνος της ακτινοβόλησης.

Η καμπύλη μεταβολής για την Κουρκουμίνη Ι περιγράφεται από την εξίσωση: y = 55,66 * $e^{-x/15,8}$ + 35,37 με R² = 0,97778, όπου y είναι η τιμή του μέγιστου φθορισμού μετά την ακτινοβόληση και x ο χρόνος της ακτινοβόλησης.

Και στις δύο ουσίες, ο μέγιστος φθορισμός παρουσιάζει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης. Πιο συγκεκριμένα, για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, η μέγιστη τιμή του φθορισμού πριν την ακτινοβόληση είναι 147,21 AU (πίνακας 9) ενώ μετά το πέρας των 30 λεπτών έχει φτάσει στην τιμή 67,23 AU, δηλαδή έχει παρουσιάσει πτώση της τιμής κατά 54,34 %. Παρόμοια πτώση παρουσιάζει και η Κουρκουμίνη Ι. Η φωτολεύκανση με τη μέθοδο φθορισμού είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της σταθερότητας του φθορισμού με το χρόνο, απουσία ακτινοβόλησης, για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, με σταθερές τις συνθήκες, με σκοπό να διαπιστωθεί αν το περιβάλλον επηρεάζει τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Όπως παρατηρείται και στο συγκριτικό διάγραμμα, η τιμή του φθορισμού παραμένει σχεδόν σταθερή, οπότε τα φάσματα φθορισμού που προκύπτουν δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον. Επομένως το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου παρουσιάζει σταθερότητα ως προς τον φθορισμό απουσία ακτινοβόλησης.

6.6 Φασματοσκοπική μελέτη ικανότητας παραγωγής ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

Η μελέτη της ικανότητας παραγωγής των ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου έγινε με τη χρήση της ουσίας NADH και η μεθοδολογία παρουσιάζεται στην ενότητα 5.1.6. Για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Lambda 35, UV/VIS Spectrometer, Perkin – Elmer (ενότητα 4.2.1). Τα φάσματα λαμβάνονται στο εύρος μηκών κύματος 300 nm -700 nm και η καταγραφή της απορρόφησης γίνεται στα 340 nm, καθώς εκεί δημιουργείται η χαρακτηριστική κορυφή του NADH . Η ισχύς που ακτινοβολήθηκε το δείγμα είναι 12,50 mW/cm².

Το διάλυμα συνολικού όγκου 3 ml αποτελείται από:

- 73,5 μΙ διαλύματος NADH, το οποίο πάρθηκε από το μητρικό διάλυμα του NADH με συγκέντρωση C = 4.37 mM και διαλύτη PBS
- 300 μΙ διαλύματος συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης C = 10^{-5} M
- 2626,5 μl DMSO

Τα φάσματα απορρόφησης λαμβάνονται ανά λεπτό ακτινοβόλησης (ενότητα 4.2.3) στο χρονικό διάστημα από 0 min έως 10 min και ανά 5 λεπτά ακτινοβόλησης στο χρονικό διάστημα 10 min έως 30 min. Κατά την ακτινοβόληση γίνεται χρήση ενός μαγνήτη ανάδευσης, έτσι ώστε η ακτινοβόληση να πραγματοποιείται ομοιόμορφα σε ολόκληρο το διάλυμα.

6.6.1 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με συγκέντρωση 10⁻⁵ Μ στους διάφορους χρόνους ακτινοβόλησης (σχήμα 49), καθώς και το συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης ως προς το χρόνο, στα 340 nm με και χωρίς ακτινοβόληση (σχήμα 50).



Σχήμα 49: Φάσματα απορρόφησης συγκέντρωσης 10⁻⁵ Μ για χρόνους ακτινοβόλησης 0 min – 30 min του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

Χρόνος	Τιμή απορρόφησης στα
ακτινοβόλησης	340 nm
0	0,594
1	0,581
2	0,551
3	0,523
4	0,495
5	0,473
6	0,456
7	0,436
8	0,421
9	0,404
10	0,393
15	0,338
20	0,303
25	0,281
30	0,269

Πίνακας 10: Πίνακας τιμών χρόνου ακτινοβόλησης και τιμής απορρόφησης στα 340 nm του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου



Σχήμα 50: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm, με ακτινοβόληση και χωρίς ακτινοβόληση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

6.6.2 Σύγκριση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου με Κουρκουμίνη Ι

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα συγκριτικά διαγράμματα μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι με συγκέντρωση C = 10⁻⁵ M συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης (σχήμα 51).



Σχήμα 51: Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης

6.6.3 Συμπεράσματα

Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε είναι 10⁻⁵ M σε διαλύτη DMSO και για τις δύο ουσίες. Στα φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου παρατηρούνται δύο κορυφές. Η μία κορυφή είναι στα 444 nm και είναι χαρακτηριστική του συμπλόκου. Η δεύτερη κορυφή παρατηρείται στα 340 nm και αντιστοιχεί στο διάλυμα του NADH. Ωστόσο και οι δύο κορυφές παρουσιάζουν πτώση συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης. Η μείωση της κορυφής που αντιστοιχεί στα 444 nm, οφείλεται στη φωτολεύκανση, ενώ για τη κορυφή στα 340 nm, οφείλεται στην οξείδωση του NADH σε NAD⁺ το οποίο εμφανίζει μειωμένη απορρόφηση, δηλαδή στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών μέσα στο διάλυμα. Η τιμή της απορρόφησης πριν την ακτινοβόληση είναι 0,594 (πίνακας 10), ενώ μετά το πέρας των 30 λεπτών παρατηρείται πτώση κατά 54,72 %. Για την Κουρκουμίνη Ι η πτώση της απορρόφησης στα 340 nm μετά από 30 λεπτά ακτινοβόλησης είναι 53,41 %.

Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι η μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολίας είναι:

- y = 61,1 * e^{-x/11,42} + 40,54 με R² = 0,99865 για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου
- y = 102,11 * e^{-x/40,62} 2,19 με R² = 0,99968 για την Κουρκουμίνη Ι

όπου γ είναι η τιμή της απορρόφησης και x ο χρόνος της ακτινοβόλησης. Και για τις δύο ουσίες, η πτώση της απορρόφησης της κορυφής στα 340 nm πραγματοποιείται εκθετικά με βάση το χρόνο ακτινοβόλησης.

Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου προκαλεί γρήγορη πτώση στην τιμή της απορρόφησης του NADH από τα πρώτα κιόλας λεπτά της ακτινοβόλησης οπότε σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα παρουσιάζει μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στην περίπτωση της Κουρκουμίνης Ι, ακολουθείται μία σταθερή πτώση στο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν τα ίδια πειράματα για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου χωρίς ακτινοβόληση με σταθερές τις συνθήκες και διαπιστώθηκε ότι πρακτικά η κορυφή του NADH στα 340 nm παραμένει ανεπηρέαστη, όπως είναι αναμενόμενο, καθώς απουσία φωτός δεν παράγονται ελεύθερες ρίζες.

6.7 Μελέτη τοξικότητας των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7

Στην ενότητα αυτή μελετάται η επαγόμενη τοξικότητα του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7. Ο έλεγχος της τοξικότητας των κυττάρων απουσία φωτός είναι αναγκαίος, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή που θα χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία, η οποία δε θα είναι από μόνη της τοξική για τα κύτταρα. Οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι που μελετήθηκαν είναι 1 μΜ, 3 μΜ και 5 μΜ. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλο plate κι έπειτα εισάγονται οι συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται στην ενότητα 5.3. Η κάθε συγκέντρωση εισάγεται σε 4 πηγαδάκια, ενώ σε 6 πηγαδάκια δε γίνεται εισαγωγή κάποιας ουσίας, ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν αναφορά. Για τη μελέτη της τοξικότητας γίνεται χρήση του πρωτοκόλλου βιωσιμότητας της μεθόδου MTT το οποίο αναλύεται στην ενότητα 5.3.1.

Μετά τη χρήση του πρωτοκόλλου βιωσιμότητας ΜΤΤ, διαπιστώθηκε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων παραμένει στο 100 % και για τις 3 συγκεντρώσεις των δύο ουσιών, καθώς και για την αναφορά. Δηλαδή καμία συγκέντρωση δεν είναι κυτταροτοξική για καμία από τις δύο ουσίες. Οπότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι για την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μεγαλύτερη από αυτές, δηλαδή τα 5 μΜ, χωρίς να είναι τοξική για τα κύτταρα.

6.8 Μελέτη χωρικού εντοπισμού των ουσιών στη κυτταρική

σειρά MCF-7

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού είναι απαραίτητη πριν εφαρμοστεί η φωτοδυναμική θεραπεία για να διαπιστωθεί η θέση της συγκέντρωσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι μέσα στα κύτταρα MCF-7. Η θέση που εντοπίζονται οι ουσίες είναι σημαντική, καθώς από αυτήν εξαρτάται η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 5.4, γίνεται η προετοιμασία των τριβλίων με 100.000 κύτταρα σε 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου το κάθε ένα και μετά από 24 ώρες εισάγεται στο ένα τριβλίο σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου συγκέντρωσης 5 μM, στο άλλο τριβλίο εισάγεται Κουρμουμίνη Ι της ίδιας συγκέντρωσης και στο τελευταίο δεν εισάγεται καμία ουσία, καθώς θα χρησιμοποιηθεί σαν αναφορά για τον πιθανό αυτοφθορισμό των κυττάρων. Τα τριβλία αυτά τοποθετούνται στο κλίβανο για να επωαστούν για 3 ώρες. Αφού περάσουν οι 3 ώρες, γίνεται η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser Leica TCS SP8 MP.

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο αυτό. Στα αριστερά είναι οι εικόνες από το μικροσκόπιο σάρωσης με laser (ενότητα 4.2.4), ενώ στα δεξιά είναι οι αντίστοιχες εικόνες που παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο (σχήμα 52, σχήμα 53, σχήμα 54):

91
• Σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου







Σχήμα 52: Εικόνες χωρικού εντοπισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου

Κουρκουμίνη Ι









Σχήμα 53: Εικόνες χωρικού εντοπισμού Κουρκουμίνης Ι



• Αναφορά

Σχήμα 54: Εικόνες αναφοράς

Παρατηρώντας και συγκρίνοντας τις εικόνες του χωρικού εντοπισμού των δύο ουσιών με αυτές της αναφοράς αλλά και μεταξύ τους, γίνεται κατανοητό ότι η συσσώρευση των ουσιών δε γίνεται στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά γύρω από αυτόν. Ο πυρήνας του κυττάρου στις παραπάνω εικόνες παρατηρείται σαν μία σκοτεινή περιοχή στο κέντρο των κυττάρων. Η συσσώρευση των ουσιών στον πυρήνα είναι ανεπιθύμητη, καθώς μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις του DNA μιας και εκεί είναι αποθηκευμένο το γενετικό υλικό. Ακόμη, παρατηρείται πως στο χρονικό διάστημα των 3 ωρών, οι ουσίες απορριφθήκανε ικανοποιητικά από τα κύτταρα, χωρίς να έχουν προκαλέσει αλλαγή στη μορφολογία τους. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς αποδεικνύεται ότι οι δύο αυτές ουσίες με συγκέντρωση 5 μΜ δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα. Η ένταση του φθορισμού του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου δείχνει να είναι μεγαλύτερη από αυτή της Κουρκουμίνης Ι. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ουσία εισχώρησε στα κύτταρα σε μεγαλύτερο ποσοστό στο χρονικό διάστημα των 3 ωρών, καθώς η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φωτοευαισθητοποιητή μέσα στα κύτταρα.

6.9 Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά MCF-7

Η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητές το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 5 μΜ και για τις δύο ουσίες. Η ακτινοβόληση έγινε με ισχύ 6 mW/cm², ενώ η χρονική διάρκεια της ακτινοβόλησης ήταν 167 sec (περίπου 3 λεπτά), 334 sec (περίπου 6 λεπτά) και 501 sec (περίπου 9 λεπτά), οπότε η συνολική δόση ενέργειας είναι τελικά 1 J/cm², 2 J/cm² και 3 J/cm² αντίστοιχα.

Η μεθοδολογία της διαδικασίας περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 5.5. Εν συντομία στο plate καλλιεργούνται τα κύτταρα με 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και αφήνεται στο κλίβανο για 24 ώρες για να γίνει η επώαση των κυττάρων. Μετά το πέρας των 24 ωρών, γίνεται η εισαγωγή των δύο ουσιών σε 6 επαναλήψεις για κάθε χρόνο ακτινοβόλησης. Σε 12 πηγαδάκια εισάγεται μόνο το πλήρες θρεπτικό μέσο, χωρίς κάποια ουσία για να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά. Έπειτα το plate αφήνεται στο κλίβανο για 3 ώρες και μετά το πέρας των 3 ωρών γίνεται η αφαίρεση του υπερκειμένου και πραγματοποιείται η ακτινοβόληση (ενότητα 4.2.3). Μετά την ακτινοβόληση εισάγονται στα πηγαδάκια από 100 μl πλήρους θρεπτικού μέσου και τοποθετούνται στο κλίβανο για 24 ώρες για να γίνει ο έλεγχος βιωσιμότητας MTT, για τον οποίο έχει γίνει περιγραφή στην ενότητα 5.3.1.

Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα βιωσιμότητας των κυττάρων (%) συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης (min) των φωτοευαισθητοποιητών σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνη Ι καθώς και της αναφοράς (σχήμα 55).



Σχήμα 55: Βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7 συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης για τις δύο ουσίες και την αναφορά

Για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, μετά την ακτινοβόληση των 3 λεπτών και συνολικής δόσης ενέργειας 1 J/cm², η βιωσιμότητα των κυττάρων έχει πέσει περίπου στο 97 %, το οποίο ποσοστό δεν είναι σημαντικό. Μεγαλύτερη ενέργεια ακτινοβόλησης, δηλαδή μεγαλύτεροι χρόνοι ακτινοβόλησης αύξησαν περαιτέρω τον κυτταρικό θάνατο, καθώς μετά την ακτινοβόληση των 6 λεπτών και συνολικής δόσης ενέργειας 2 J/cm², η βιωσιμότητα των κυττάρων έχει πέσει στο 90 %, ενώ μετά την ακτινοβόληση των 9 λεπτών και συνολικής δόσης ενέργειας 3 J/cm² έχει πέσει στο 80 %. Παρατηρείται δηλαδή μια συνεχώς αυξανόμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας με αύξηση της ενέργειας ακτινοβόλησης.

Για την ουσία Κουρκουμίνη Ι, παρατηρείται ότι δεν προκλήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων, καθώς μετά την ακτινοβόληση των 3 λεπτών η βιωσιμότητα των κυττάρων έπεσε στο 98 %, ενώ μετά την ακτινοβόληση των 6 και 9 λεπτών μειώθηκε κι έμεινε σταθερή στο 95 %, το οποίο ποσοστό δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Όσον αφορά την αναφορά, η βιωσιμότητα των κυττάρων παραμένει μετά την κάθε ακτινοβόληση στο 100%, πράγμα που είναι αναμενόμενο, καθώς δεν έχει εισαχθεί κάποια ουσία και δεν υπάρχει λόγος να μειωθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων.

Συγκριτικά το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου έδειξε αποτελεσματικότερη κυτταροτοξική δράση μετά από τη φωτοδυναμική θεραπεία σε σύγκριση με την Κουρκουμίνη Ι. Ωστόσο οι συνθήκες ακτινοβόλησης θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά ώστε να επιτευχθούν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας.

Κεφάλαιο 7°: Συζήτηση

7.1 Συμπεράσματα

7.1.1 Απορρόφηση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι σε διάφορες συγκεντρώσεις και διάφορους διαλύτες

της απορρόφησης για διάφορες συγκεντρώσεις Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι διατηρούν τη χαρακτηριστική τους μορφή. Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, είναι απαραίτητο η φωτοευαίσθητη ουσία να απορροφά ακτινοβολία, καθώς η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι αλληλένδετη με την ικανότητα της απορρόφησής της. Η μεταβολή της μέγιστης απορρόφησης των δύο ουσιών, σε σχέση με τη συγκέντρωση είναι γραμμική. Ωστόσο, το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου παρουσιάζει μία μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος του φάσματος για τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κι αυτό ίσως να οφείλεται στα συσσωματώματα που δημιουργούνται μέσα στο διάλυμα λόγω υψηλής συγκέντρωσης.

Για συγκέντρωση 2 x 10⁻⁵ M, το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου εμφανίζει υψηλότερη απορρόφηση συγκριτικά με την Κουρκουμίνη Ι, στο εύρος μηκών κύματος 340 nm – 560 nm με μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 482 nm, ενώ για την Κουρκουμίνη Ι το εύρος είναι 300 nm – 500 nm με μέγιστη τιμή απορρόφησης τα 435 nm. Συνεπώς το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου, εμφανίζει απορρόφηση μετατοπισμένη σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την Κουρκουμίνη Ι, ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό ενός υποψήφιου φωτοευαισθητοποιητή. Ωστόσο καμία από τις δύο ουσίες δεν απορροφά ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην κόκκινη περιοχή του φάσματος, ώστε να είναι μεγαλύτερο το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας και να έχει υψηλή ζώνη απορρόφησης. Για αυτό το λόγο οι δύο αυτές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία κυρίως για επιφανειακές παθήσεις και καρκίνους κι όχι για εσωτερικούς όγκους στο ανθρώπινο σώμα.

Για τη μελέτη της απορρόφησης σε διάφορους διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν δύο οργανικοί διαλύτες (DMSO και αιθανόλη) κι ένας πολικός (PBS). Και για τις δύο

ουσίες, όταν χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMSO και αιθανόλη, τα φάσματα απορρόφησης δείχνουν να διατηρούν τη χαρακτηριστική τους μορφή, με ελάχιστη μετατόπιση στο μήκος κύματος όπου παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση. Ο διαλύτης αιθανόλη προκαλεί μία ελαφριά μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος και για τις δύο ουσίες σε σύγκριση με το φάσμα απορρόφησης σε DMSO.

Όταν χρησιμοποιείται ο διαλύτης PBS, τα φάσμα απορρόφησης παρουσιάζουν μεγάλη μετατόπιση σε μικρότερα μήκη κύματος συγκριτικά με τους άλλους διαλύτες. Ακόμη, η τιμή της μέγιστης απορρόφησης μειώνεται περίπου στο μισό. Επιπλέον, όσον αφορά το διάλυμα της Κουρκουμίνης Ι σε διαλύτη PBS στο φάσμα απορρόφησης παρατηρείται και μία δεύτερη κορυφή στα 358 nm. Το PBS είναι ένα υδατικό μέσο, οπότε τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν λόγω της τάσης των μορίων της ουσίας να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικούς διαλύτες, οπότε η απορρόφηση των ουσιών από τα κύτταρα εμποδίζεται σημαντικά, για αυτό και παρουσιάζει τόσο μεγάλη πτώση. Μία ενδεχόμενη λύση για να μη δημιουργούνται τα συσσωματώματα είναι να μεταφέρονται οι ουσίες έγκλειστες σε φορείς μεταφοράς.

7.1.2 Φθορισμός συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι σε διάφορες συγκεντρώσεις

Στα φάσματα του φθορισμού παρατηρείται πως διατηρείται η μορφή του φάσματος για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις και για τις δύο ουσίες. Η τιμή του μέγιστου φθορισμού παρουσιάζεται στα 531 nm και για τις δύο ουσίες. Ωστόσο, τη μέγιστη τιμή του φθορισμού την παρουσιάζει η Κουρκουμίνη Ι. Συνεπώς, η προσθήκη του Γαλλίου στην Κουρκουμίνη Ι, δεν άλλαξε το σχήμα και τη θέση του φάσματος φθορισμού αλλά μείωσε σημαντικά την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Η μεταβολή της τιμής του φθορισμού είναι γραμμική ως προς τη συγκέντρωση της κάθε ουσίας για το εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκε. Και οι δύο ουσίες παρουσιάζουν εκπομπή στην περιοχή 450 nm – 600 nm περίπου, οπότε πέρα από τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία ως φωτοευαισθητοποιητές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη διάγνωση των καρκινικών όγκων.

7.1.3 Φωτολεύκανση συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και Κουρκουμίνης Ι με τις μεθόδους απορρόφησης και φθορισμού

Η απορρόφηση του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης παρουσιάζει γραμμική πτώση και μετά το πέρας των 30 λεπτών φτάνει στο 82 % της αρχικής της τιμής, ενώ της ουσίας Κουρκουμίνη Ι παρουσιάζει εκθετική πτώση και μετά το πέρας των 30 λεπτών φτάνει στο 52 % της αρχικής της τιμής. Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου παρουσιάζει φωτοσταθερότητα, καθώς η απορρόφηση της ουσίας τα πρώτα 10 λεπτά της ακτινοβόλησης παραμένει σχεδόν σταθερή και έπειτα μειώνεται εντονότερα. Αντίθετα, η ουσία Κουρκουμίνη Ι φωτοκαταστρέφεται γρηγορότερα.

Για τη μελέτη της φωτολεύκανσης με τη μέθοδο του φθορισμού, η τιμή του μέγιστου φθορισμού και για τις δύο ουσίες παρουσιάζεται στα 531 nm. Και στις δύο ουσίες, ο μέγιστος φθορισμός παρουσιάζει εκθετική πτώση ως προς το χρόνο της ακτινοβόλησης. Η φωτολεύκανση με τη μέθοδο φθορισμού είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις καθώς τα φάσματα είναι παραπλήσια με την διαφορά ότι η Κουρκουμίνη Ι παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή του φθορισμού από ότι το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου.

Τα πειράματα της φωτολεύκανσης παίζουν καθοριστικό ρόλο για την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας, για να διαπιστωθεί αν μία ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φωτοευαισθητοποιητής. Είναι σημαντικό η φωτοευαίσθητη ουσία να είναι φωτοσταθερή στα πρώτα λεπτά της ακτινοβόλησής της για να διατηρεί τη δράση της. Στη συνέχεια είναι απαραίτητο να παρουσιάζει φωτοκαταστροφή, δηλαδή να αρχίσει να μειώνεται η δράση της ουσίας για να μην παραμείνει φωτοευαισθησία στο σώμα του ασθενούς.

7.1.4 Παραγωγή ελευθέρων ριζών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι

Η ικανότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών έγινε με τη μελέτη της κορυφής στα 340 nm των φασμάτων απορρόφησης, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί η οξείδωση του NADH σε NAD⁺. Η κορυφή αυτή παρουσιάζει πτώση συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών μέσα στο διάλυμα.

Η μεταβολή της απορρόφησης στα 340 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης πραγματοποιείται εκθετικά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, η πτώση για το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι 54,72 %, ενώ για την Κουρκουμίνη Ι είναι 53,41 %. Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου προκαλεί γρήγορη πτώση της τιμής της απορρόφησης από τα πρώτα κιόλας λεπτά της ακτινοβόλησης οπότε σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα παρουσιάζει μεγάλη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, η Κουρκουμίνη Ι, ακολουθεί σταθερή πτώση της απορρόφησης στο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών.

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά την ακτινοβόληση είναι σημαντική κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς είναι συνδεδεμένη με την κυτταροτοξικότητα. Δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών, τόσο πιο δραστική είναι η θεραπεία.

7.1.5 Τοξικότητα των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-7 απουσία φωτός

Ο έλεγχος της τοξικότητας των κυττάρων απουσία φωτός είναι αναγκαίος πριν την εφαρμογή της φωτοδυναμικής δράσης, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή που θα χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία, η οποία θα είναι η μέγιστη δυνατή και δεν θα είναι τοξική για τα κύτταρα απουσία φωτός.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων παραμένει στο 100 % για τις συγκεντρώσεις 1 μΜ, 3 μΜ και 5 μΜ των δύο ουσιών. Δηλαδή καμία συγκέντρωση δεν είναι κυτταροτοξική για καμία από τις δύο ουσίες. Οπότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι για την εφαρμογή

της φωτοδυναμικής θεραπείας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση 5 μΜ που είναι και η μεγαλύτερη, χωρίς να είναι τοξική για τα κύτταρα.

7.1.6 Χωρικός εντοπισμός των ουσιών στη κυτταρική σειρά MCF-

7

Η μελέτη του χωρικού εντοπισμού είναι απαραίτητη πριν την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας για να διαπιστωθεί η ενδοκυττάρια θέση συγκέντρωσης του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι. Η θέση που εντοπίζονται οι ουσίες αυτές είναι σημαντική, καθώς από αυτήν εξαρτάται η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Με βάση τις εικόνες του χωρικού εντοπισμού των δύο αυτών ουσιών, συμπεραίνεται ότι η συσσώρευσή τους γίνεται γύρω από το πυρήνα των κυττάρων, χωρίς να έχει προκληθεί κάποια αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων. Αυτό το συμπέρασμα είναι σημαντικό, καθώς αποδεικνύεται ότι οι δύο αυτές ουσίες με συγκέντρωση 5 μΜ δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα.

7.1.7 Εφαρμογή φωτοδυναμικής θεραπείας στη κυτταρική σειρά MCF-7

Η εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως φωτοευαισθητοποιητές το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι, συγκέντρωσης 5 μΜ. Η ακτινοβόληση έγινε με ισχύ 6 mW/cm², για χρόνους ακτινοβόλησης 3 λεπτά, 6 λεπτά και 9 λεπτά, με συνολική δόση ενέργειας 1 J/cm², 2 J/cm² και 3 J/cm² αντίστοιχα.

Από το διάγραμμα βιωσιμότητας των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου ακτινοβόλησης των φωτοευαισθητοποιητών του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου και της Κουρκουμίνης Ι γίνεται φανερό ότι για την Κουρκουμίνη Ι παρατηρείται ελάχιστος κυτταρικός θάνατος για όλους τους χρόνους ακτινοβόλησης, δηλαδή της ενέργειας ακτινοβόλησης. Την αποτελεσματικότερη κυτταροτοξική δράση την παρουσιάζει το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου για χρόνο ακτινοβόλησης 9 λεπτά,

καθώς ο κυτταρικός θάνατος έφτασε το 20 %. Δηλαδή, το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικότερα στη φωτοδυναμική θεραπεία ως φωτοευαισθητοποιητής για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο οι συνθήκες ακτινοβόλησης θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν για να επιτευχθούν μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας.

7.2 Μελλοντικά σχέδια - Προοπτικές

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη παρούσα εργασία έδειξαν ότι το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου είναι ένας πολλά υποσχόμενος φωτοευαισθητοποιητής που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου εμφανίζει βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τη Κουρκουμίνη Ι, όπως η μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, η μεγαλύτερη συγκέντρωση στα καρκινικά κύτταρα και η αποτελεσματικότερη φωτοδυναμική δράση. Ωστόσο, υπάρχουν μια σειρά πειραμάτων τα οποία θα πρέπει να γίνουν προς την κατεύθυνση της βελτιστοποίησης της φωτοδυναμικής θεραπείας με το σύμπλοκο Κουρκουμίνης-Γαλλίου.

- Μελέτη του συμπλόκου Κουρκουμίνης-Γαλλίου ως φωτοευαισθητοποιητή και σε άλλες κυτταρικές σειρές, για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά της και για άλλες μορφές καρκίνου
- Πραγματοποίηση πειραμάτων με τις ουσίες να είναι έγκλειστες σε φορείς μεταφοράς για να μη δημιουργούνται συσσωματώματα
- Πραγματοποίηση πειραμάτων φωτοδυναμικής θεραπείας σε πειραματόζωα,
 για να διαπιστωθεί η φωτοδυναμική δράση, η πιθανή παραμένουσα
 φωτοευαισθησία στους ζωντανούς οργανισμούς και να βελτιστοποιηθούν οι
 διάφορες παράμετροι της μεθόδου, όπως είναι η δόση του
 φωτοευαισθητοποιητή, ο χρόνος και η δόση ακτινοβόλησης
- Μελέτη των ουσιών για φωτοδυναμική διάγνωση του καρκίνου
- Μελέτη της επιλεκτικότητας της ουσίας σε καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με τα υγιή, καθώς ο φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να συγκεντρώνεται μόνο στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα

 Μελέτη χρόνου αποδέσμευσης της ουσίας από τα υγιή κύτταρα, για να μπορεί ο ασθενής να φεύγει γρήγορα από το νοσοκομείο, χωρίς να ενεργοποιείται η ουσία από το ηλιακό φως

Βιβλιογραφία

- [1] M. D. Daniell and J. S. Hill, «A history of photodynamic therapy,» *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, vol. 61, no. 5, pp. 340-348, 1991.
- [2] M. H. Abdel-Kader, «History of Photodynamic Therapy,» σε *Photodynamic Therapy*, *From Theory to Application*, Berlin, Springer, 2014, pp. 3-22.
- [3] G. I. Stables and D. V. Ash, «Photodynamic therapy,» *Cancer Treatment Reviews,* vol. 21, no. 4, pp. 311-323, 1995.
- [4] S. Zhang, L. Yang, X. Ling, et al., «Tumor mitochondria-targeted photodynamic therapy with a translocator protein (TSPO)-specific photosensitizer,» *Acta Biomaterialia*, vol. 28, pp. 160-170, 2015.
- [5] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, et al., "Photodynamic Therapy of Cancer: An Update," CA: A Cancer Journal for Clinicians, vol. 61, no. 4, pp. 250-281, 2011.
- [6] E. J. Hong, D. G. Choi and M. S. Shim, «Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials,» *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 6, no. 4, pp. 297-307, 2016.
- [7] A. P. Castano, T. N. Demidova and M. R. Hamblin, «Mechanisms in photodynamic therapy: part one—-photosensitizers, photochemistry and cellular localization,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, no. 4, pp. 279-293, 2014.
- [8] R. R. Allison and K. Moghissi, «Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms,» *Focused Review Series: Photodynamic Therapy*, vol. 46, no. 1, pp. 24-29, 2013.
- [9] T. J. Dougherty, C. J. Gomer and B. W. Henderson, «Photodynamic Therapy,» JNCI: Journal of the National Cancer Institute, vol. 90, no. 12, pp. 889-905, 1998.
- [10] J. M. Dąbrowski and L. G. Arnaut, «Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment,» *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 14, no. 10, pp. 1765-1780, 2015.
- [11] «Photoimmune Discoveries,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://photoimmune.org/photodynamic-therapy/#imageclose-418.
- [12] W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier, «Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications,» *Drug Discovery Today*, vol. 4, no. 11, pp. 507-517, 1999.
- [13] Q. Xiao, J. Wu, X. Pang, et al., «Discovery and Development of Natural Products and their Derivatives as Photosensitizers for Photodynamic Therapy,» *Current Medicinal Chemistry*, vol. 25, no. 7, pp. 839-860, 2018.

- [14] Α. Κουτσονικολή, «Συγκριτικές μελέτες φωτοφυσικών ιδιοτήτων παραγώγων της,» Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2015.
- [15] Κ. Θ. Καζαντζής, «Συγκριτική μελέτη φωτοευαίσθητων παραγώγων κουρκουμίνης με χρήση μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας φθορισμού,» Διπλωματική εργασία, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2017.
- [16] C. A. Robertson, D. Hawkins Evans and H. Abrahamse, «Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT,» *Journal* of Photochemistry and Photobiology B: Biology, vol. 96, no. 1, pp. 1-8, 2009.
- [17] A. P. Castano, T. N. Demidova and M. R. Hamblin, «Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, no. 1, pp. 1-23, 2005.
- [18] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal και M. R. Hamblin, «Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer,» *Cancers*, vol. 3, no. 2, pp. 2516-2539, 2011.
- [19] M. Abou-Ghali and J. Stiban, «Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 22, no. 6, pp. 760-772, 2015.
- [20] «Tool Module: Apoptosis (Programmed Cell Death),» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://thebrain.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html.
- [21] Y. Liu and B. Levine, «Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy,» *Cell Death and Differentiation*, vol. 22, pp. 367–376, 2015.
- [22] R. R. Allison and C. H. Sibata, «Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 7, no. 2, pp. 61-75, 2010.
- [23] S. B. Brown, E. A. Brown and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment," *Lancet Oncol*, vol. 5, no. 8, pp. 497–508, 2004.
- [24] E. Paszko, C. Ehrhardt, M. O. Senge, et al., «Nanodrug Applications in Photodynamic Therapy,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 8, no. 1, pp. 14-29, 2011.
- [25] S. H. Voon, L. V. Kiew, H. B. Lee, et al., «In Vivo Studies of Nanostructure-Based Photosensitizers for Photodynamic Cancer Therapy,» *small*, vol. 10, no. 24, pp. 4993-5013, 2014.
- [26] C. F. van Nostrum, «Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy,» Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 56, no. 1, pp. 9-16, 2004.
- [27] J. Shi, Y. Liu, L. Wang, et al., «A tumoral acidic pH-responsive drug delivery system based on a novel photosensitizer (fullerene) for in vitro and in vivo chemophotodynamic therapy,» Acta Biomaterialia, vol. 10, no. 3, pp. 1280–1291, 2014.

- [28] M. R. Hamblin, «Fullerenes as Photosensitizers in Photodynamic Therapy: Pros and Cons,» Photochemical & Photobiological Sciences, vol. 17, no. 11, pp. 1515-1533, 2018.
- [29] P. G. Calavia, G. Bruce, L. Pérez-García and D. A. Russell, «Photosensitiser-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy of cancer,» *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 17, no. 11, pp. 1534-1552, 2018.
- [30] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman and B. B. Aggarwal, «Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises,» *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, vol. 4, no. 6, pp. 807–818, 2007.
- [31] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani and H. Ichikawa, «CURCUMIN: THE INDIAN SOLID GOLD,» ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 595, pp. 1-75, 2007.
- [32] A. Goel, A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal, «Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 75, no. 4, pp. 787-809, 2008.
- [33] «Easy to Grow Bulbs,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.easytogrowbulbs.com/products/ginger-curcuma-longaturmeric?variant=31581624012.
- [34] J. Ives, «News Medical Life Sciences,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.newsmedical.net/news/20200717/Study-reveals-antiviral-effects-of-curcumin.aspx.
- [35] T. A. DahL, P. Bilski, K. J. Reszka and C. F. Chignell, «PHOTOCYTOTOXICITY OF CURCUMIN,» Photochemistry and Photobiology, vol. 59, no. 3, pp. 290-294,, 1994.
- [36] H. H. Tønnesen, J. Karlsen and G. B. van Henegouwen, «Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin,» *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, vol. 183, pp. 116-122, 1986.
- [37] B. B. Aggarwal, A. Kumar and A. C. Bharti, «Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies,» Anticancer Research, vol. 23, no. 1A, pp. 363-398, 2003.
- [38] J. Epstein, I. R. Sanderson and T. T. MacDonald, «Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies,» *British Journal of Nutrition*, vol. 103, no. 11, pp. 1545–1557, 2010.
- [39] S. Shishodia, G. Sethi and B. B. Aggarwal, «Curcumin: Getting Back to the Roots,» *New York Academy of Sciences,* vol. 1056, no. 1, pp. 206–217, 2005.
- [40] M. C. Andrade, A. P. Dias Ribeiro, L. N. Dovigo, et al., «Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of Candida spp,» *Archives of Oral Biology*, vol. 58, no. 2, pp. 200-210, 2013.
- [41] C. Santezi, B. D. Reina and L. N. Dovigo, «Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review,» *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 21, pp. 409–415, 2018.

- [42] K. T. Kazantzis, K. Koutsonikoli, B. Mavroidi, et al., «Curcumin derivatives as photosensitizers in photodynamic therapy: photophysical properties and in vitro studies with prostate cancer cells,» *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 19, no. 2, pp. 193-206, 2020.
- [43] N. C. Araújo, R. F. de Menezes, V. S. M. Carneiro, et al., «Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer,» *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 35, no. 5, pp. 259-263, 2017.
- [44] H. H. Tønnesen, H. de Vries, J. Karlsen and G. Beijersbergen van Henegouwen, «Studies on curcumin and curcuminoids IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76, no. 5, pp. 371-373, 1987.
- [45] T. A. Dahl, W. M. McGowan, M. A. Shand and V. S. Srinivasan, «Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin,» *Archives of microbiology*, vol. 151, no. 2, pp. 183-185, 1989.
- [46] R. P. A. de Matos, M. F. Calmon, C. F. Amantino, et al., «Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines,» *BioMed Research International*, vol. 2018, 2018.
- [47] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://people.bath.ac.uk/gp304/uv/PerkinElmer_Lambda35_manual_EN.pdf.
- [48] «Perkin-Elmer LS 45 Luminescence Spectrometer User's Guide,» [Ηλεκτρονικό].
- [49] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardwaresoftware/confocal-microscopes.
- [50] Θ. Βαλαβανίδης and Κ. Ευσταθίου, «Οι μέχρι σήμερα "Ενώσεις του Μήνα",» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://195.134.76.37/chemicals/chem_DMSO.htm.
- [51] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-andrecipes/pbs-phosphate-buffered-saline.
- [52] «National Library of Medicine,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol.
- [53] «Βικιπαίδεια,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%B9%CE%B8%CE%B1%CE%BD%CF%8C%CE% BB%CE%B7.
- [54] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.bioserendipity.com/anti-aging-supplementsii/nad_nadh/.
- [55] «Wikipedia,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotinamide_adenine_dinucleotide.
- [56] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://go.drugbank.com/drugs/DB00157.

- [57] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-1016/nadh.
- [58] Θ. Βαλαβανίδης and Κ. Ευσταθίου, «Οι μέχρι σήμερα "Ενώσεις του Μήνα",» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://195.134.76.37/chemicals/chem_EDTA.htm.
- [59] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.labome.com/method/Fetal-Bovine-Serum.html.
- [60] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cellculture/classical-media-salts/dmem.html.
- [61] «Βικιπαίδεια,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://el.wikipedia.org/wiki/2-%CF%80%CF%81%CE%BF%CF%80%CE%B1%CE%BD%CF%8C%CE%BB%CE%B7.
- [62] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.indiamart.com/proddetail/isopropyl-alcohol-20125383173.html.
- [63] [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html.
- [64] R. D. Almeida, B. J. Manadas, A. P. Carvalho and C. B. Duarte, «Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews* on Cancer, vol. 1704, no. 2, pp. 59–86, 2004.